

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Otimização do direcionamento para células
tumoriais de nanosistemas lipídicos para uso
terapêutico**

Denys Holovanchuk

Dissertação
Mestrado em Bioquímica
Área de especialização: Bioquímica Médica
2014

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Otimização do direcionamento para células
tumoriais de nanosistemas lipídicos para uso
terapêutico**

Denys Holovanchuk

Dissertação

Mestrado em Bioquímica

Área de especialização: Bioquímica Médica

2014

Dissertação orientada por:

Doutora Maria Luísa Teixeira Azevedo Rodrigues Corvo (iMed.ULisboa/FFUL)

Prof. Doutora Helena Susana Pappámikail da Costa Marinho (CQB/FCUL)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que tornaram possível a realização desta dissertação e cuja ajuda foi crucial em todas as etapas do trabalho.

Em primeiro lugar, o meu agradecimento especial é dirigido à minha orientadora externa, Doutora Maria Luísa Corvo, pela sua orientação neste trabalho e, sobretudo, por acreditar em mim desde o início do estágio. A sua elevada competência científica, as suas críticas, conselhos e apoio nos momentos menos felizes ajudaram-me a evoluir tanto a nível profissional como a nível pessoal.

O meu enorme agradecimento à minha orientadora interna, Prof. Doutora Helena Susana Marinho, por todos os conselhos e ensinamentos no laboratório, na elaboração da tese e na revisão de outros documentos produzidos durante este ano. Agradeço imenso o apoio e a disponibilidade ao longo de todo o ano.

Agradeço profundamente à Doutora Manuela Colla pela generosa cedência do péptido Antagonista G e de todo o material e reagentes necessários ao acoplamento do mesmo aos lipossomas. Tanto a partilha do seu conhecimento, como todo o seu apoio e disponibilidade ao longo desta etapa do trabalho foram bastante valiosos no desenvolvimento desta tese.

Sem a Doutora Manuela Colla e o Doutor João Nuno Moreira da Universidade de Coimbra, que generosamente cedeu as células H69, o estudo da internalização dos lipossomas nesta linha seria impossível. O meu enorme agradecimento pela sua ajuda. Agradeço também ao Rui (amigo e ex-colega, ainda que por breves momentos do iMed, Lumiar) pelo transporte das mesmas.

À Eng. Bárbara Martins, pela sua disponibilidade e partilha do seu conhecimento no manuseamento do evaporador rotatório de pressão controlada e, também, pela sua simpatia e interesse no meu trabalho.

À Ana Saraiva, pela sua amizade, ajuda muito valiosa na bancada e, sobretudo, na elaboração do *poster* para o “PBP World Meeting”. O seu apoio foi crucial para a participação neste meu primeiro congresso internacional, pela qual estou muito agradecido.

Agradeço especialmente à Doutora Carla Real e à Prof. Doutora Luísa Cyrne pela sua ajuda nas técnicas de extracção de RNA e RT-PCR. Adicionalmente, quero agradecer a disponibilidade e os conselhos importantes da Doutora Carla Real na técnica de microscopia de fluorescência e na manutenção de culturas celulares que contribuíram em muito para o sucesso deste trabalho.

Ao Doutor Paulo Marcelino por acreditar neste trabalho e à associação *O Fígado pela Vida*, pela ajuda financeira.

Agradeço também aos meus colegas e amigos do laboratório do iMed (FFUL, pólo do Lumiar), Susana, Carla, Ana Saraiva e Alexandra e também dos laboratórios do CQB (FCUL), Filipe, Ana Jerónimo, Ana Bagulho, Joaquim, Filipa e André, pelo seu acolhimento, amizade e por tornar os dias de trabalho mais agradáveis e divertidos. Um grande obrigado à Catarina pela sua amizade e ajuda com o espectrofluorímetro.

Aos meus amigos de curso, Paulo, Samuel, Miguel, David, André, João Bento e muitos outros por ajudar a soltar as energias acumuladas com os regulares jogos de futebol.

Um obrigado especial à Raquel, por estar sempre presente nos momentos mais críticos e por nunca duvidar de mim, mesmo quando eu o fazia. Obrigado pelo apoio, pelas críticas e, sobretudo, pelo carinho e amizade que tornaram o trabalho mais fácil.

Não podia esquecer os meus amigos fora da faculdade, Guilherme, Ricardo, João Góis, Rafael, Krasimir, Carolina e Cátia, que estão comigo desde que caí de pára-quedas em Portugal e desde aí nunca se afastaram. Obrigado a todos pelo apoio e pelas histórias.

Por último, gostaria de agradecer aos meus pais e à minha família, por estarem sempre presentes e por acreditarem em mim em todas as minhas escolhas no meu percurso pessoal e académico. Obrigado pela oportunidade de concretizar os meus sonhos. *Щиро вам вдячний, рідні мої!*

"We make ourselves significant by the courage of our questions, and the depth of our answers."

Carl Sagan, *Cosmos* (1980)

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
I. INTRODUÇÃO	1
1. Lipossomas	3
1.1. Métodos de preparação	5
1.1.1. Hidratação do filme lipídico	6
1.1.2. Injecção de solvente.....	6
1.1.3. Evaporação de Fase Reversa	7
1.1.4. Diálise de Detergente.....	7
1.2. Homogeneização e redução de tamanho	7
1.3. Aumento de escala.....	8
2. Caracterização de lipossomas	9
2.1. Espectrometria de Correlação Fotónica.....	9
2.2. Potencial Zeta.....	11
2.3. Temperatura de transição de fase	13
3. Classificação e aplicação terapêutica de lipossomas	14
4. Tipos de direccionamento de agentes terapêuticos	17
4.1. Direccionamento para o sistema fagocitário mononuclear.....	17
4.2. Direccionamento Passivo	18
4.3. Direccionamento Activo	19
4.3.1. Direccionamento com Anticorpos.....	21
4.3.2. Direccionamento com Péptidos	22
4.3.3. Direccionamento com pequenas moléculas	23
5. Acoplamento de Antagonista G e Ácido Fólico à superfície de lipossomas.....	25
5.1. Ligação covalente de Péptidos	27
5.2. Ligação covalente de Ácido Fólico.....	29
6. Endocitose de nanopartículas	30
6.1. Endocitose mediada por Clatrina	32
6.2. Endocitose mediada por Caveolina.....	32
6.3. Endocitose mediada por receptores de Folato	33
6.4. Trafego intracelular de nanopartículas	34

II. OBJECTIVOS	37
Objectivos.....	39
III. MATERIAIS E MÉTODOS	41
1. Materiais	43
1.1. Reagentes.....	43
1.2. Células	44
2. Métodos	44
2.1. Preparação de lipossomas direccionados com ácido fólico	44
2.1.1. Activação do ácido fólico com um grupo sulfidrílo	44
2.1.2. Caracterização do processo de activação do ácido fólico	45
2.1.3. Preparação de lipossomas.....	49
2.1.4. Ligação do AF-SH aos lipossomas.....	50
2.2. Preparação de lipossomas direccionados com antagonista G	51
2.2.1. Activação do antagonista G com um grupo sulfidrílo	51
2.2.2. Ligação do antagonista G aos lipossomas pelo método directo	51
2.2.3. Ligação do antagonista G aos lipossomas pelo método de pós inserção.	52
2.3. Caracterização dos lipossomas	52
2.3.1. Doseamento de lípido	52
2.3.2. Doseamento do ácido fólico.....	53
2.3.3. Doseamento do antagonista G.....	53
2.3.4. Determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas	54
2.3.5. Determinação do potencial zeta	54
2.4. Determinação da expressão do receptor de folato FR α em células HeLa e MCF7 por RT-PCR55	
2.4.1. Desenho de <i>primers</i> de FR α	55
2.4.2. Extracção de RNA e electroforese em gel de agarose	56
2.4.3. Síntese de DNA complementar a partir do RNA extraído	57
2.4.4. Reacção em cadeia do polimerase (PCR)	57
2.5. Ensaio de internalização celular de lipossomas por microscopia de fluorescência ..	58
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
1. Notas introdutórias	63
2. Activação e ligação covalente de Ácido Fólico aos Lipossomas.....	65
2.1. Optimização do protocolo de doseamento do ácido fólico	65
2.1.1. Espectroscopia de absorção UV/Visível	66

2.1.2.	Espectroscopia de fluorescência	70
2.2.	Estudo das propriedades físico-químicas do dimetilsulfóxido.....	77
2.3.	Activação do ácido fólico com um grupo sulfidrilo	79
2.3.1.	Esterificação do ácido fólico com NHS	80
2.3.2.	Substituição nucleofílica de ácido fólico-NHS (AF-NHS) com cisteamina	87
2.3.3.	Rendimento da reacção	91
2.4.	Ligação do Ácido Fólico aos Lipossomas	94
2.4.1.	Preparação e caracterização de lipossomas de longo tempo de circulação.....	94
3.	Ligação do Antagonista G aos Lipossomas.....	102
3.1.	Activação do antagonista G com um grupo sulfidrilo	102
3.2.	Ligação do antagonista G aos lipossomas.....	103
3.2.1.	Método directo de ligação	103
3.2.2.	Método de pós-inserção	104
3.3.	Doseamento do antagonista G e rendimento da ligação.....	105
4.	Internalização de Lipossomas em Células Tumerais	108
4.1.	Estudo da expressão do receptor de folato (FR α) em células HeLa e MCF7	109
4.2.	Optimização da internalização de lipossomas direccionados com ácido fólico	112
4.3.	Internalização de lipossomas direccionados com antagonista G	120
V.	CONCLUSÕES.....	123
	Conclusões	125
VI.	PERSPECTIVAS FUTURAS	129
	Perspectivas Futuras	131
	BIBLIOGRAFIA.....	133
	ANEXOS/APPENDICES	139
	APPENDIX 1: Poster Communication for “CQB Day”	141
	APPENDIX 2: Data to be published.....	147

ABREVIATURAS

AF – ácido fólico;

AF-NHS – ácido fólico esterificado com N-hidroxisuccinimida;

AF-SH – produto da reacção do éster de N-hidroxisuccinimida do ácido fólico com cisteamina;

cDNA – DNA complementar;

CHEMS – hemisuccinato de colesterol (*cholesteryl hemisuccinate*);

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindole;

DCC – diciclohexil carbodiimida;

DLPC – 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina;

DLS – espectroscopia de correlação fotónica (*dynamic light scattering*);

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle medium*;

DMPC – 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina;

DMSO – dimetilsulfóxido;

DOGS – 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-succinato;

DOPC – 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina;

DOTAP – 1,2-dioleoil-3-propano de trimetilamónia;

DOTMA – 1,2-di-O-octadecenil-3-propano de trimetilamónia;

DPBS – *Dulbecco's phosphate-buffered saline*;

DPPC – 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina;

DSPC – 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina;

DSPE-PEG₂₀₀₀ – 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-polietilenoglicol2000;

DSPE-PEG₂₀₀₀-AF – 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-[N-polietilenoglicol2000-ácido fólico];

DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida – 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-[N-polietilenoglicol2000-maleimida];

DTNB – 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico;

DTT – ditioneitol;

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético;

EGF – factor de crescimento da epiderme (*epidermal growth factor*);

EMBL-EBI – *European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute*;

EPC – fosfatidilcolina da lecitina de ovo;

FBS – soro fetal bovino (*bovine fetal serum*);

FFR – mudança de campo rápida (*fast field reversal*);

FR – receptor de folato (*folate receptor*);

GAPDH – 3-fosfato de gliceraldeído desidrogenase (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*);

GPCRs – receptores acoplados a proteína G;

GPI – glicosilfosfatidilinositol;

HER2 – receptor 2 do factor de crescimento de epiderme humano (*human epidermal growth factor receptor 2*);

LDV – velocimetria de laser baseada no efeito de Doppler (*laser Doppler velocimetry*);

MLVs – vesículas multilamelares (*multilamellar vesicles*);

MPS – sistema mononuclear fagocitário (*mononuclear phagocytic system*);

mRNA – RNA mensageiro;

NHS – N-hidroxisuccinimida;

PAA – poliacrilamida;

PALS-M3 – *Phase Analysis Light Scattering-Mixed Mode Measurement*;

PCR – reacção em cadeia do polimerase (*polymerase chain reaction*);

PDI – índice de polidispersão (*polydispersion index*);

PDP – 2-piridilditiopropionil;

PEG₂₀₀₀ – polietilenoglicol de 2000 Da de massa molecular;

PEI – polietilenoimina;

PE-Rhod – N-lissamina B sulfonil Rodamina ligada a fosfatidiletanolamina da lecitina de ovo;

pHLIP® - *pH low insertion peptide*;

PLGA – ácido poliláctico co-glucónico (*poly(lactic-co-glycolic acid)*);

POPC – 1-palmitoil-2-oleoil -sn-glicero-3-fosfatidilcolina;

POX – polioxasolina;

PTFE – politetrafluoroetileno;

PVP – polivinilpirrolidona;

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium*;

rRNA – RNA ribossomal;

RTKs – receptores de tirosina cinase;

RT-PCR – reacção do transcriptase reverso seguida da reacção em cadeia do polimerase (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*);

SCLC – carcinoma de pulmão de células pequenas (*small cell lung carcinoma*);

SLNs – nanopartículas lipídicas sólidas (*solid lipid nanoparticles*);

SUVs – pequenas vesículas unilamelares (*small unilamellar vesicles*);

TAE – tampão Tris-acetato-EDTA;

TCEP – tris(2-carboxietil) fosfina

TEA – trietilamina;

TLC – cromatografia em camada fina;

xxPE – xx-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina;

xxPG – xx-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol;

xxPS – xx-sn-glicero-3-fosfatidilserina;

RESUMO

Lipossomas de longo tempo de circulação têm surgido como opções muito promissoras de sistemas de entrega de fármacos a células cancerígenas. Estas partículas são revestidas por polietilenoglicol (PEG), cuja função pode ser alargada para além dos horizontes de melhoria da sua biodistribuição. A possibilidade de modificação funcional por ligação covalente nas suas extremidades levou ao aparecimento de estratégias de direccionamento activo, nomeadamente com pequenas moléculas como ácido fólico (AF), explorando a sobreexpressão dos receptores de folato em inúmeros tipos de tumores.

Neste trabalho, a ligação do AF aos lipossomas previamente formados foi explorada como um método único e alternativo aos actualmente existentes na preparação deste tipo de partículas. Com este objectivo, AF foi activado com um grupo sulfidrílico e ligado covalentemente aos lipossomas contendo DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida. Este processo não alterou o tamanho nem a carga dos lipossomas e permitiu obter quantidades de AF (detectado após a ligação) até 34 % (mol AF/maleimida).

Adicionalmente foram preparados lipossomas modificados com o péptido antagonista G para direccionar os lipossomas para as células do carcinoma de pulmão, aplicando o mesmo método de ligação e por um método alternativo em que o péptido ligado ao DSPE-PEG-maleimida é inserido em lipossomas previamente formados (método de pós-inserção), ambos com elevados rendimentos de ligação, em comparação ao ácido fólico (71 % e 43 % mol péptido/maleimida, respectivamente).

Os lipossomas foram testados *in vitro* em diferentes linhas celulares tumorais. O direccionamento com AF foi testado em células HeLa e MCF7 (elevada expressão e sem expressão de receptores de folato, respectivamente). Por outro lado, o direccionamento com antagonista G foi testado em células H69 que sobreexpressam receptores de neuropéptidos. A internalização de lipossomas direccionados, marcados com fosfatidiletanolamina de ovo marcada com rodamina, foi observada por microscopia de fluorescência.

Palavras-chave: lipossomas; polietilenoglicol; ácido fólico; antagonista G; direccionamento activo.

ABSTRACT

Drug delivery systems targeted to tumor cells are an ever-growing field in cancer research. One of the most successful strategies in this field consists of employing long circulating liposomes as drug carriers. The presence of poly-(ethylene glycol) (PEG) on their surface allows membrane stabilization, decreases protein-liposome interactions and allows surface modification with molecules that recognize cell-specific surface markers. One of the most commonly and successfully employed targeting molecules is folic acid, which binds with high affinity to folate receptors, overexpressed in a wide variety of tumors.

The present study addressed the development of a simple, yet unique method of linking covalently a targeting molecule to the surface of pre-formed PEGylated liposomes. Herein, the protocol of grafting liposomes with folic acid *after* their preparation was studied and optimized. For this purpose, folic acid was activated with a sulfhydryl group and linked to liposomes, containing DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide. This process did not interfere with liposome size or ζ potential and it was possible to detect this vitamin up to 34 % (mol FA/maleimide) in liposomes after linkage.

Additionally, liposomes targeted to the lung carcinoma cells with the peptide antagonist G were prepared by the same method and by the post-insertion method (where DSPE-PEG-peptide was inserted in the liposomal bilayer), both with high linkage efficiency (71 % and 43 % mol peptide/maleimide respectively).

In order to assess the targeting ability of prepared liposomes, *in vitro* internalization studies were conducted with different cell lines. Folate receptor overexpressing and non-expressing cell lines HeLa and MCF7 were cultured in presence of FA targeted liposomes and neuropeptide receptor overexpressing cells, H69 (lung carcinoma) were cultured in presence of antagonist G targeted liposomes. The cellular uptake of fluorescently labeled liposomes (egg-phosphatidylethanolamine-rhodamine) was assessed by fluorescence microscopy. However, no qualitative differences were observed in the internalization patterns for all cell lines.

Keywords: *liposomes; poly(ethylene) glycol; folic acid; antagonist G; active targeting.*

I. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos têm-se vindo a observar grandes avanços na biotecnologia, bioquímica e indústria farmacêutica, que num processo sinérgico possibilitam a identificação de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças. No entanto, a identificação de um alvo terapêutico por si só não é suficiente para o tratamento, sendo todo o processo de circulação do fármaco no organismo até à chegada ao local de acção crucial para a sua eficácia. Problemas como a degradação enzimática, interacção com proteínas em circulação, acumulação em locais inespecíficos, etc. constituem grandes obstáculos para a eficácia terapêutica de diversos compostos. Por esta razão, os esforços de criar compostos eficientes no tratamento têm sido aliados aos esforços da biotecnologia e nanomedicina de criar sistemas de entrega de fármacos aos locais desejados no organismo, melhorando a sua biodistribuição, farmacocinética e aumentando o seu índice terapêutico.⁶ Como resultado, têm surgido diversos nano e microsistemas de entrega de fármacos no organismo como, por exemplo, nano e micropartículas poliméricas (partículas de PLGA, polipéptidos, polianidridos, poli ϵ -caprolactona), lipídicas (lipossomas, lipoplexos, SLNs) ou partículas contendo polímeros naturais (quitosano, dextrano).

O presente estudo focou-se principalmente na entrega selectiva de compostos a células tumorais usando lipossomas, devido à sua semelhança com membranas biológicas, elevada estabilidade, versatilidade de modificação e facilidade de preparação.

1. Lipossomas

Os lipossomas são estruturas lipídicas constituídas por bicamadas fechadas e concêntricas, resultantes de dispersão de (fosfo)lípidos polares num solvente aquoso. A existência de regiões hidrófobas (bicamadas lipídicas) e hidrófilas (espaço interno) no mesmo nanosistema torna estas partículas bastante atractivas do ponto de vista de transporte e entrega de compostos hidrossolúveis ou lipossolúveis. É possível incorporar moléculas insolúveis ou solúveis em água na bicamada lipídica ou no interior hidrófilo, respectivamente, desses sistemas, desta forma possibilitando o seu transporte em fluidos biológicos.

Estes sistemas foram descritos pela primeira vez no início da década de 1960 por Bangham e colegas,⁷ que observaram a formação de estruturas esféricas (usando microscopia electrónica) quando filmes lipídicos com lecitina de ovo eram hidratados com solventes aquosos. Estas estruturas lipídicas assemelham-se às membranas biológicas, na medida em que são constituídas por moléculas amfifílicas dispostas em bicamada, delimitando espaços aquosos.. Devido a este facto, o principal uso de lipossomas começou por ser como exemplos de modelos membranares para o estudo de transporte, permeabilidade, interações moleculares e cinéticas de fusão membranares. Com o surgimento de novos métodos de preparação de lipossomas, o seu potencial cresceu exponencialmente em diversas áreas. A possibilidade de um melhor controlo de tamanho, número de bicamadas e carga superficial de lipossomas possibilitou uma manipulação melhor destes sistemas para serem empregues em ramos como a indústria alimentar, cosmética, agricultura e, sobretudo, indústria farmacêutica e investigação clínica.⁸

Devido a uma elevada variabilidade de sistemas lipídicos, o termo, *lipossoma* é bastante geral e necessita de informação adicional na sua descrição. Esta informação compreende a indicação do tamanho (desde 50 nanómetros a vários micrómetros de diâmetro), índice de polidispersão (PDI, dá informação acerca da homogeneidade de tamanhos de uma suspensão lipossomal), composição lipídica (geralmente é indicada em razões molares de cada componente e pode incluir lípidos modificados com diferentes moléculas), carga superficial (indicada através do potencial zeta, ζ) e, no caso de se tratar de lipossomas usados para a encapsulação de compostos, a indicação de eficiência de encapsulação também é um dado imprescindível na caracterização, bem como a lamelaridade e a capacidade total de encapsulação (capacidade de carga).⁹

Os lipossomas são constituídos, maioritariamente, por glicerofosfolípidos, lípidos constituídos por uma molécula de glicerol esterificada com duas cadeias acilo e com um grupo fosfato ligado a um resíduo de colina, etanolamina, serina ou inositol, sendo que é esse grupo polar que determina as propriedades físico-químicas de cada tipo de fosfolípido. Outro componente bastante importante presente na maior parte das formulações lipossomais é o colesterol. A sua função é a de um regulador de estabilidade da bicamada (tal como em membranas biológicas). Para além desses

componentes principais, é possível utilizar outros lípidos como esfingolípidos (ceramidas) e alguns tensioactivos, dependendo da aplicação da formulação preparada. Dependendo da sua composição e métodos de preparação, os lipossomas podem apresentar nomes diferentes. Wagner e Karola apresentam uma extensa tabela que classifica as partículas lipídicas consoante a sua composição, método de preparação e aplicação.¹⁰

É de salientar que a natureza e a proporção de cada um dos componentes da formulação lipídica determinam o seu comportamento no organismo, ou seja, a sua estabilidade físico-química, capacidade de transporte e libertação do fármaco no local desejado.¹¹ Isto deve-se a elevada variabilidade de lípidos que podem ser usados na preparação de lipossomas, bem como a possibilidade da sua modificação (conjugação com moléculas que alteram as propriedades físico-químicas), o que torna este sistema num dos melhores veículos de entrega de fármacos no organismo.

1.1. Métodos de preparação

Na preparação de lipossomas para o uso como sistemas de entrega de fármacos, o objectivo principal é originar partículas monodispersas, estáveis, com um tamanho bem controlado e com a quantidade adequada de composto de interesse encapsulado (fármacos). Para tal, os métodos actualmente existentes são optimizados de modo a garantir um processo rápido, eficiente, reprodutível e rentável.

A maior parte dos métodos de preparação de lipossomas têm quatro passos em comum: dissolução da mistura lipídica em solvente orgânico, seguida da sua evaporação; suspensão da mistura lipídica num solvente aquoso, formando vesículas polidispersas; purificação de lipossomas preparados; análise do produto final (doseamento lipídico, e do composto encapsulado, se for esse o caso, determinação do tamanho e potencial zeta).¹² As misturas lipídicas geralmente são compostas por diferentes tipos de glicerofosfolípidos, como fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina ou fosfatidilinositol. Estes fosfolípidos podem ser de origem sintética ou natural (por exemplo as lecitinas de ovo ou de soja) e a sua escolha influencia parâmetros fundamentais como o potencial zeta, a estabilidade da

membrana, a sua permeabilidade, interações entre diferentes partículas ou entre outros componentes da mistura.¹³

Os métodos mais usuais, chamados métodos clássicos, foram desenvolvidas e otimizados para escalas relativamente pequenas e têm sido amplamente usados em laboratórios de investigação. Entre os mais conhecidos está o método de hidratação do filme lipídico (após a evaporação completa do solvente orgânico), método de evaporação de fase reversa, método de injeção de solvente e diálise de detergente.

1.1.1. Hidratação do filme lipídico

O método de hidratação do filme lipídico, também chamado método de Bangham,⁷ é o método mais usual de preparação de lipossomas. A mistura inicial de fosfolípidos (e colesterol) é dissolvida num solvente orgânico (geralmente clorofórmio) que é evaporado à secura, formando um filme lipídico. No caso de se tratar da incorporação de um fármaco hidrófobo, este é dissolvido em conjunto com os lípidos no solvente orgânico. O filme é hidratado com um solvente aquoso, contendo fármaco hidrófilo, se for o caso, e, segundo o processo termodinâmico mais favorável, os lípidos organizam-se em bicamadas concêntricas, contendo o fármaco hidrófobo ao nível das membranas e o fármaco hidrófilo no seu espaço interior. Apesar de ser termodinamicamente favorável, a formação de lipossomas a partir da hidratação de um filme, tem de ocorrer com fornecimento de energia (mecânica, sob a forma de agitação), de modo a ultrapassar a energia de activação que estabiliza o filme. Este procedimento tem de ocorrer a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase dos lípidos usados. As vesículas formadas por este método normalmente são polidispersas, com tamanhos superiores a 1 µm de diâmetro, com estruturas multilamelares, denominadas de *Multilamellar Vesicles* (MLV).

1.1.2. Injecção de solvente

O método de *Injecção de solvente* baseia-se na dissolução da mistura lipídica num solvente orgânico (geralmente éter ou etanol), seguida da sua injeção numa solução aquosa (contendo o fármaco a encapsular). A injeção de uma solução lipídica em etanol numa solução aquosa apresenta a vantagem de possibilitar a formação rápida de lipossomas com tamanhos na ordem de 100 nm, podendo não necessitar passos de

dimensionamento/redução de tamanho.^{12,14} A presença de etanol na mistura final é uma desvantagem deste processo, na medida em que limita a concentração lipossomal a ser formada, o que compromete a eficácia de encapsulação. Por outro lado, a injeção de lípidos dissolvidos em éter elimina esta desvantagem. Uma vez que éter é imiscível com água, este pode ser removido imediatamente após a injeção. As soluções lipídicas são injectadas em soluções aquosas aquecidas acima do ponto de ebulição do éter, e este é eliminado assim que entra em contacto com a outra fase.

1.1.3. Evaporação de Fase Reversa

É um método que se baseia na evaporação do solvente orgânico em que os lípidos estão dissolvidos, formando um filme. Este filme é novamente dissolvido num outro solvente (geralmente éter de dietilo ou éter de isopropilo) sob fluxo de azoto. Após a introdução de um solvente aquoso, há uma tendência para dar origem a vesículas oligamelares e unilamelares. O solvente orgânico pode ser facilmente removido, enquanto a mistura se mantém sob fluxo de azoto ou com a ajuda de um evaporador rotatório de pressão controlada (sob vácuo). Este método é bastante útil para encapsular grandes quantidades do composto (hidrófilo) de interesse ou até estruturas macromoleculares de maiores dimensões, uma vez que uma parte substancial da fase aquosa é encapsulada no interior dos lipossomas.⁹

1.1.4. Diálise de Detergente

Por último, o método de *Diálise de Detergente* destina-se a originar lipossomas com tamanhos homogéneos, na ordem de 50-100 nm. O seu princípio passa simplesmente pela dissolução de lípidos na presença de um tensoactivo (detergente) acima da sua concentração micelar crítica, de modo a formar micelas mistas (contendo fosfolípidos e detergente). À medida que as moléculas de detergente são removidas, por diálise controlada, as moléculas de fosfolípidos organizam-se em bicamadas, formando lipossomas unilamelares com tamanhos homogéneos.¹⁵

1.2. Homogeneização e redução de tamanho

Para um melhor controlo do tamanho das vesículas formadas pelos métodos acima mencionados, estas podem ser sonicadas (formando *Small Unilamellar Vesicles*, SUV) ou extrusadas por filtros de polycarbonato de poro de tamanho variável.^{13,16} A energia

fornecida por ultrassons reorganiza as vesículas em suspensão, reduzindo o seu tamanho e a heterogeneidade, ou seja, a polidispersão da população lipossomal.

A técnica de extrusão emprega-se para um melhor controlo sobre o processo de dimensionamento dos lipossomas. As suspensões polidispersas, como os MLVs resultantes da hidratação de um filme lipídico são passadas por filtros de policarbonato de poro variável (geralmente 600, 400, 200 e 100 nm) de uma forma sequencial. O processo sequencial de redução de tamanho de poro é vantajoso no sentido de otimizar a homogeneização e a facilidade de execução desta técnica (vesículas demasiado grandes, > 600 nm, passariam com muita dificuldade por poros de 100 nm, devido à elevada tensão de corte que resulta desta diferença de tamanhos). No final deste procedimento, a população de lipossomas adquire uma distribuição normal de tamanhos em torno do valor desejado (no caso de se usar filtros de 100 nm, os lipossomas normalmente adquirem tamanhos na ordem de 130 nm) e com um índice de polidispersão reduzido.

Existem duas variantes desta técnica: extrusão a pressão elevada e a pressão reduzida. Extrusão a pressão elevada e com filtros de poro reduzido, origina uma população lipossomal maioritariamente constituída por vesículas oligolamelares; por outro lado, extrusão a pressão reduzida tende a originar partículas unilamelares.

1.3. Aumento de escala

Uma das maiores desvantagens dos métodos convencionais de preparação de lipossomas está na dificuldade de aumento de escala de produção destas partículas. Uma vez que estas surgem como alternativa/apoio aos fármacos existentes no mercado, a optimização da produção de lipossomas necessita também de tomar um rumo em direcção às exigências de consumo a escalas mais alargadas. Estes métodos requerem usos de grandes quantidades de solventes orgânicos, bem como necessidade de grande quantidade de energia para homogeneizar/diminuir os tamanhos de partículas formadas, o que seria impraticável a uma escala industrial. Por exemplo, a presença de quantidades vestigiais de solventes como o clorofórmio no produto final, inviabiliza o método que usar este solvente pelo facto de ser tóxico para o organismo. Como alternativa estão a surgir métodos que tentam evitar o uso de solventes tóxicos

ou obviar certos passos energeticamente mais dispendiosos na formação de lipossomas. Os métodos como o *Método de Aquecimento*, que se baseia no aquecimento da dispersão lipossomal na presença de glicerol, *Freeze Drying*, *Spray Drying* ou métodos de injeção de etanol modificados, são apenas alguns exemplos de alternativas mais eficazes que estão em desenvolvimento com o objectivo de aplicar o uso de lipossomas a uma escala bastante superior.

2. Caracterização de lipossomas

Os diferentes métodos de preparação de lipossomas descritos são normalmente bastante reprodutíveis, originando lotes com características físico-químicas muito semelhantes entre si. No entanto, de modo a ser possível comparar, quantitativamente ou qualitativamente os ensaios usando lipossomas, é necessário ter em conta parâmetros muito precisos que os caracterizam.

Os factores de caracterização de lipossomas mencionados na secção de 1. *Lipossomas* são imprescindíveis para comparar e comunicar dados globalmente. A caracterização de lipossomas pode ser mais extensa, caso se pretenda estudar a dinâmica de membrana ou outros parâmetros biofísicos destas partículas. É comum encontrar estudos que incluem dados acerca da transição de fase dos lípidos da bicamada (determinados por calorimetria, bastante útil na determinação quer da localização quer da eficácia de incorporação de fármacos hidrófobos na bicamada lipídica), quantidade residual do solvente orgânico usado na preparação de lipossomas, estabilidade (em diferentes solventes e fluidos biológicos e a diferentes temperaturas (temperatura de armazenamento ou fisiológica), o perfil de libertação do composto encapsulado, e outros, dependendo do propósito do respectivo estudo.

De seguida serão explicadas as técnicas mais usadas na determinação do tamanho e carga dos lipossomas, bem como os fundamentos teóricos subjacentes a cada uma.

2.1. Espectrometria de Correlação Fotónica

Esta técnica, também conhecida como *Dynamic Light Scattering* (DLS) é empregue como ferramenta de determinação de tamanho de partículas usada nos aparelhos da

Malvern Instruments®. O princípio básico da técnica consiste em fazer incidir um laser (fonte de luz monocromática), numa solução a analisar e determinar a intensidade da luz refractada numa determinada direcção. O tamanho da partícula tem de ser menor do que o comprimento de onda da luz incidente, de modo a ocorrer a chamada dispersão de Rayleigh. Neste caso, a luz incidente não é reflectida, pela partícula. A dispersão da luz incidente pelas partículas em suspensão pode ser observada numa determinada direcção (o ângulo do detector em relação à fonte pode variar). Nesta direcção o sinal detectado é sob a forma de um padrão de pontos escuros e claros que resulta da dispersão de luz de todas as partículas em suspensão e que varia ao longo do tempo. Dadas duas partículas que refractam a luz numa determinada direcção a intensidade total recebida pelo detector irá depender do tipo de interferência da radiação refractada por estas partículas (interferência construtiva dá origem a um sinal maior e interferência destrutiva faz diminuir o sinal detectado). Devido ao movimento browniano das partículas o padrão detectado (resultante das interferências de milhões de partículas em suspensão) varia ao longo do tempo. Quanto maiores são as partículas, menores são os seus movimentos Brownianos em solução e mais lenta será a variação do padrão detectado (e vice-versa).

O grau de similaridade, ou correlação entre os padrões detectados em diferentes instantes pode ser quantificado, dando informação acerca da mobilidade e, consequentemente, do tamanho das partículas em suspensão.

No caso simples de uma partícula, dada uma direcção (q), as intensidades medidas no tempo t e após um certo *delay* τ são correlacionadas pela função de autocorrelação (eq. 1).

$$g^2(q; \tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad \text{Eq. 1}$$

Para *delays* (τ) muito baixos, os sinais de intensidade medidos são bastante próximos, pelo que os dois sinais têm uma elevada correlação (perto de 1). À medida que o tempo de *delay* aumenta, a correlação decai exponencialmente. O movimento das partículas pode ser relacionado com o seu tamanho, segundo a equação de Stokes-Einstein (eq. 2;

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad \text{Eq. 2}$$

k_B : constante de Boltzmann, T : temperatura, η : viscosidade do meio, D : constante de difusão, R_H : raio hidrodinâmico).

No caso de uma população de partículas, a função que descreve as intensidades detectadas é vista como soma de funções de correlação de partículas individuais e é tratada por algoritmos que permitem extrair dados acerca da população em análise. No caso dos instrumentos Malvern®, o *software* usado, *Zetasizer* utiliza como método de análise padrão a análise de cumulantes para tratar a função de correlação de intensidades obtida. A análise de cumulantes é um método matemático de tratar a curva de correlação, que permite exprimir os valores de correlação em função do *delay* (τ), sob a forma de uma polinomial. O ajuste dos resultados é feito pelo método dos quadrados mínimos (método linear). Deste ajuste resultam os valores de tamanho, índice de polidispersão (PDI), entre outros.

2.2. Potencial Zeta

Partículas carregadas em suspensão (numa solução electrolítica) atraem iões de carga oposta à sua superfície, criando uma camada à sua volta. Esta camada mais próxima da superfície da partícula é designada como *Camada de Stern*¹⁷ (em homenagem a Otto Stern) e contém os iões ligados por forças electrostáticas, com uma mobilidade reduzida em relação à superfície carregada. À volta desta primeira camada é formada outra camada de iões, mais fracamente associados à partícula e com maior liberdade. Esta camada mais difusa geralmente não acompanha a partícula nos seus movimentos e não tem limites tão definidos como a camada de Stern (figura 1).¹ Estas duas camadas são referidas como bicamada eléctrica e a sua interface é definida pelo limite a partir do qual os iões em solução não acompanham o movimento da partícula quando é aplicado um campo eléctrico. Esta interfase é medida através do potencial zeta, que mede a mobilidade electroforética da partícula.

Quando é aplicado um campo eléctrico, as partículas em suspensão movem-se em direcção ao eléctrodo de carga oposta até atingirem uma velocidade constante (equilíbrio entre as forças atractivas do campo eléctrico e forças em direcção oposta devido à viscosidade do meio). Esta velocidade pode ser medida através da dispersão de luz que se faz incidir na amostra, usando técnicas de Espectroscopia de Correlação

INTRODUÇÃO

Fotónica, usando o princípio conhecido como Velocimetria de Laser, baseada no efeito de Doppler (*Laser Doppler Velocimetry*, LDV).

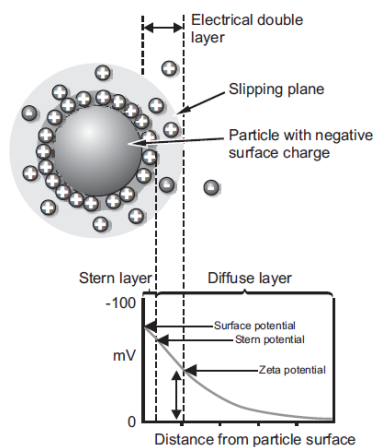


Figura 1: Esquema da bicamada Eléctrica de uma partícula carregada em suspensão numa solução aquosa (citado de¹)

Este princípio compreende a medição da luz refractada pela amostra sujeita a um campo eléctrico constante, comparando a frequência da luz refractada pela amostra (depende da sua mobilidade electroforética) com a frequência da luz de referência. Contudo, para partículas de maiores dimensões ou com potencial zeta reduzido, a imprecisão relativa a este método torna-se bastante significativa.

Os instrumentos da MALVERN™ de medição do potencial zeta usam um princípio chamado *Phase Analysis Light Scattering- Mixed Mode Measurement* (PALS-M3). PALS é uma variação da técnica de LDV, que analisa o desvio de fase da onda detectada em relação à fase da onda do laser de referência, em vez de comparar as frequências directamente. Como resultado, a sensibilidade da técnica é bastante mais elevada para amostras de baixa mobilidade electroforética. Aliada à PALS, a técnica de M3 aumenta ainda mais a resolução das medidas, pelo que usa o princípio de *Fast Field Reversal* (FFR) para eliminar alguns dos artefactos experimentais intrínsecos a um campo eléctrico forte constante. Como as partículas carregadas respondem mais rapidamente à mudança de campo eléctrico do que as moléculas do solvente, os artefactos experimentais, como a electro osmose são minimizados, produzindo resultados mais fidedignos.

2.3. Temperatura de transição de fase

As bicamadas fosfolípídicas podem estar em três diferentes fases, dependendo da sua estrutura (comprimento e graus de insaturação da cadeia carbonada). A fase mais rígida e mais ordenada, fase lamelar de gel (L_β), é a que tem menos graus de liberdade das moléculas de fosfolípidos. Com o aumento da temperatura, os lípidos tornam-se mais desordenados, passando para a fase intermédia em termos da ordem e difusão dos fosfolípidos na bicamada, conhecida como *ripple phase* (P_β). A temperatura a que se dá a transição para um estado de liberdade maior de fosfolípidos de membrana, ou seja a fase lamelar fluida (L_α) é chamada a temperatura de transição de fase (T_m).

Na presença de colesterol, as membranas podem adquirir uma conformação mista entre estado de gel e fluido, ou seja um estado fluido-ordenado (L_o). A figura 2 esquematiza sucintamente a dinâmica membranar descrita.

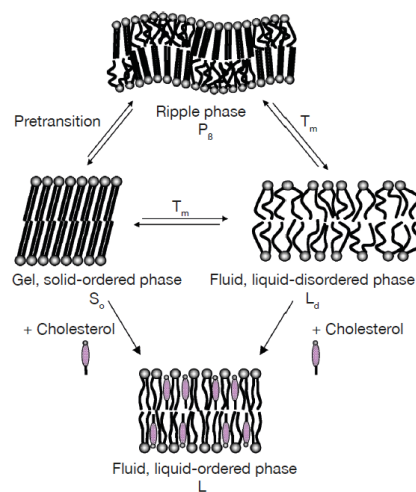


Figura 2: Representação esquemática de transição entre diferentes fases de uma bicamada fosfolípídica (citado de ³⁾)

É bastante importante conhecer esta propriedade da membrana durante a preparação de lipossomas, bem como aquando da sua aplicação. Por exemplo, o passo de extrusão do filme hidratado com filtros de poro de tamanho bastante reduzido (e.g. 0,8 – 0,05 μ m) tem de ser efectuada sempre acima da T_m da formulação usada. No caso da libertação do fármaco no organismo, a temperatura de 37 °C tem de ser compatível com uma membrana estável o suficiente para manter o composto encapsulado até o entregar ao local desejado, mas por outro lado tem de conferir flexibilidade suficiente para o libertar e/ou interagir com outros componentes biológicos. A informação acerca

INTRODUÇÃO

de T_m dos lípidos mais usados na preparação de lipossomas pode ser consultada junto dos fornecedores mais importantes de lípidos, bem como nos *Handbooks* de fosfolípidos (Tabela 1).

Tabela 1: Temperaturas de transição de fase de glicerofosfolípidos puros em meio aquoso (AVANTI Polar Lipids ®)

Cadeias acilo	Fosfatidilcolina (PC)	T _m (°C)	Fosfatidiletanolamin a (PE)	T _m (°C)	Fosfatidilserina (PS)	T _m (°C)	Fosfatidilglicerol (PG)	T _m (°C)
12:0	DLPC	-2	DLPE	29			DLPG	-3
14:0	DMPC	24	DMPE	50	DMPS	35	DMPG	23
16:0	DPPC	41	DPPE	63	DPPS	54	DPPG	41
18:0	DSPC	55	DSPE	74	DSPS	68	DSPG	55
18:1 (C9)	DOPC	-17	DOPE	-16	DOPS	-11	DOPG	-18
16:0 - 18:1(C9)	POPC	-2	POPE	25	POPS	14	POPG	-2

DL: 1,2 - dilauril; DM: 1,2 - dimiristoil; DP: 1,2 - dipalmitoil; DS: 1,2 - distearoil; DO: 1,2 - dioleoil; PO: 1-palmitoil-2-oleoil; na coluna de cadeias acilo estão indicados números de carbono e o número de ligações insaturadas, entre parêntesis está a posição da insaturação

3. Classificação e aplicação terapêutica de lipossomas

Os lipossomas podem também ser classificados de acordo com as suas características físico-químicas que influenciam o seu comportamento *in vivo/in vitro*. Assim, estes podem ser distinguidos, quanto à sua composição, quanto ao seu tamanho e o número de bicamadas.

As diferentes composições dos fosfolípidos e outros lípidos que podem ser incluídos na bicamada lipossomal determinam comportamentos como a carga, a interação com as membranas biológicas e proteínas do soro, a sua biodistribuição, o perfil farmacocinético do composto encapsulado, entre outros. As características mais importantes na classificação de lipossomas quanto a sua composição, tamanho e número de bicamadas estão representadas na Tabela 2.^{9,10,18-20}

Tabela 2: Classificação de lipossomas quanto à sua composição (adaptado de ^{10,18})

Lipossomas	Composição	Características/Função
Convencionais	Fosfolípidos neutros e colesterol	Facilmente reconhecidos por MPS, baixo tempo de circulação
Sensíveis a pH	Lípidos fusogénicos (DOPE ou PE) em conjunto com CHEMS	Endocitose mediada por clatrina, fusão membranas desencadeada por diminuição do pH, baixo tempo de circulação
Catiónicos	Lípidos catiónicos (DOTAP, DOTMA DOGS, DDAB). Compelxão com material genético origina os chamados Lipoplexos	Fusão membranas, entrega de compostos negativos (DNA, RNA), tóxicos em doses elevadas, restringidos à administração local
De longo tempo de circulação (<i>stealth</i>)	Lípidos neutros, colesterol e DSPE-PEG até 10 % (mol) de lípido total	Superfície hidrófila (devido ao PEG), maior tempo de circulação (até 40 h), elevada quantidade de PEG dificulta a internalização
Direccionados	Lipossomas convencionais ou <i>stealth</i> , com anticorpos (imunolipossomas), péptidos ou pequenas moléculas covalentemente ligados à superfície	Endocitose mediada por receptores, especificidade de entrega de fármacos, libertação de fármaco extra ou intracelular no local desejado
Etossomas	PC de soja e Etanol (na ordem de 30 %)	Aplicação tópica, com boa permeação das camadas superficiais e mais profundas da pele
Niossomas	Surfactantes não iónicos	SUVs de elevada estabilidade, pouco sensíveis a <i>stress</i> oxidativo, elevadas temperaturas e a pH alcalino
Transferssomas	PC e colato	Vesículas altamente deformáveis, usadas na penetração e entrega de fármacos a nível tópico

Todas as etapas desde a escolha da formulação e do método de preparação até à caracterização final de lipossomas são feitas com um objectivo final comum: entrega do agente terapêutico ao local desejado no organismo, com maior eficácia possível. Isto é, maximizando a concentração local do fármaco, minimizando a sua distribuição inespecífica.

Actualmente existem vários fármacos lipossomais aprovados para o tratamento de doenças cancerígenas, hepáticas, infecções fúngicas ou parasitárias e inúmeros nas fases finais de ensaios clínicos. A Tabela 3 apresenta alguns dos exemplos de compostos lipossomais aprovados ou em fases finais de ensaios clínicos nos Estados Unidos e na Europa.

Tabela 3: Fármacos lipossomais aprovados e em fases finais de ensaios clínicos (adaptado de ²¹). Entre parêntesis está indicado o ano de comercialização do respectivo fármaco

	Nome	Agente Terapêutico	Tratamento de	Fase de ensaios
Lipossomas Convencionais	DaunoXome® (1995)	daunorrubicina	Sarcoma de Kaposi	Aprovado
	Myocet/Evacet® (2000)	doxorrubicina	Sarcoma de Kaposi	Aprovado
	Depocyt® (1999)	citarabina	Meningite	Aprovado
	Ambisome® (1997)	amfotericina	Infecções fúngicas	Aprovado
Lipossomas de Longo tempo Circulação	DOXYL/Caelyx® (1997)	doxorrubicina	Sarcoma de Kaposi	Aprovado
	SPI-077	cisplatina	Diferentes tipos de cancro	Fase I/II
	Lipoplatin™	cisplatina	Diferentes tipos de cancro	Fase II/III

De entre mais de uma dezena de fármacos lipossomais aprovados, existe apenas uma formulação de lipossomas contendo polietileno glicol (PEG), lipossomas “PEGilados”, actualmente no mercado (desde 1997), DOXYL®, no Estados Unidos e Caelyx®, na Europa. Este facto pode ser explicado por diversas questões inerentes às patentes sobre o uso de PEG e seus derivados em lipossomas, bem como pela procura de polímeros mais eficazes na estabilização e biodistribuição de lipossomas. A investigação no sentido de encontrar melhores alternativas ao PEG é relativamente recente. Polímeros como a polivinilpirrolidona, (PVP), poliacrilamida (PAA) e os seus derivados, polímeros de L-aminoácidos.²¹ Kabanov A.V. e colegas actualmente se dedicam ao estudo de co-polímeros de polioxasolina, POX e co-polímeros pluorónicos, com resultados bastante promissores, em comparação com os fármacos como DOXYL®.^{22,23}

Desde a descoberta dos lipossomas até à aprovação do primeiro fármaco lipossomal (Doxyl® aprovado por US Food and Drug Administration em 1995), passaram cerca de 30 anos. No entanto, este tipo de sistemas de entrega ganha um interesse cada vez maior. Este interesse em usar lipossomas como sistemas de entrega de fármacos deriva precisamente da sua reprodutibilidade facilidade de preparação, versatilidade, capacidade de modificação (modificações covalentes dos lípidos constituintes), elevada

estabilidade, baixa toxicidade, entre outros factores que tornam os lipossomas muito atractivos no ramo da investigação clínica.^{21,24}

Uma das características mais emergentes do uso de nanopartículas na medicina é a possibilidade de as usar em terapias personalizadas. A capacidade de direccionamento activo, com o objectivo de produzir uma partícula inteligente, capaz de chegar especificamente ao local de acção e libertar o fármaco na sua dose terapêutica, sem danificar os tecidos saudáveis é um dos objectivos principais da medicina personalizada.

4. Tipos de direccionamento de agentes terapêuticos

4.1. Direccionamento para o sistema fagocitário mononuclear

O sistema fagocitário mononuclear (MPS), constituído por células fagocitárias em circulação e residentes em diferentes tecidos, tem maior tendência para reconhecer e eliminar partículas estranhas de grandes dimensões.^{21,25} Esta função pode ser um grande obstáculo a ultrapassar para direccionar nanopartículas a outras células do corpo ou poderá ser um mecanismo a explorar, quando se pretende entregar fármacos às células do sistema imunitário. No caso de o alvo terapêutico serem as próprias células fagocitárias, a injeção intravenosa de lipossomas convencionais (neutros ou aniónicos) com tamanhos até 500 nm leva ao seu reconhecimento e internalização por estas células. Por outro lado, lipossomas com dimensões superiores a 500 nm e/ou carregados positivamente induzem a produção de citocinas e apresentam uma elevada citotoxicidade e resposta imunitária sistémica.²⁶

Uma vez em circulação, as nanopartículas interagem, numa extensão maior ou menor (dependendo da sua forma, topografia de superfície, carga, tamanho e composição) com os componentes proteicos do sistema circulatório. As proteínas que participam no reconhecimento e apresentação das partículas ao MPS, as chamadas opsoninas, interagem melhor com partículas carregadas positivamente e de maiores dimensões. O complexo nanopartículas-opsoninas é reconhecido pelos macrófagos ou outras células fagocitárias em circulação ou residentes em órgãos específicos (fígado, baço) e é

fagocitado por mesmas. As partículas também podem interagir com as proteínas do sistema de complemento ou reconhecidos por anticorpos em circulação (principalmente partículas positivas, pois estas proteínas são aniónicas) e desencadear uma resposta imunitária sistémica, o que poderá ser impeditivo para a acção do fármaco ou até perigoso para o organismo.

No tratamento de doenças que afectem as células do MPS, como inflamação hepática ou esplénica (direccionamento para as células de Kupffer residentes nos respectivos órgãos) ou doenças infecciosas como a Leishmaniose, o objectivo principal é preparar lipossomas bastante “visíveis” para as células fagocitárias sem desencadear uma resposta imunitária sistémica. Para tal, os lipossomas mais adequados serão SUVs neutros ou aniónicos com tamanhos até 500 nm.

4.2. Direccionamento Passivo

Para chegar a tecidos afectados com uma localização bem definida, o direccionamento torna-se um assunto mais preponderante. Apesar de se usar na construção de lipossomas materiais naturalmente ocorrentes em todas as células, estes, ainda assim, são corpos estranhos ao organismo e necessitam de evitar o sistema imunitário para chegar ao local designado para a libertação do fármaco. Nestes casos, para melhorar a biodistribuição dos sistemas injectados, estes tem de ser modificados, de modo a minimizar os efeitos de opsonização por proteínas em circulação e, consequentemente maximizar a evasão ao sistema imunitário. Após várias tentativas neste sentido, que passaram por optimizações das formulações e manipulação do tamanho e carga dos lipossomas observou-se que lipossomas de tamanhos mais reduzidos e sem carga interagem menos com as opsoninas, apresentando maiores tempos de circulação. Para além disso, modificações superficiais com polímeros hidrossolúveis aumentam ainda mais o tempo de circulação dos mesmos.²⁷

Aumentando a permanência de partículas em circulação, aumenta-se indirectamente a sua acumulação em tecidos danificados e/ou mal formados (tumores). No caso de uma inflamação, a rede vascular que circunda a zona inflamada torna-se mais permeável, para permitir a extravasão de células fagocitárias, mas também permite a passagem de partículas com tamanhos na ordem de <150 nm, o que pode ser explorado como

possibilidade de direccionamento. No que diz respeito a tumores sólidos, o desenvolvimento anómalo e bastante acelerado de um órgão ou parte dele, é acompanhada por um processo de angiogénese também ele próprio acelerado e bastante deficiente. Como resultado, no local do tumor forma-se uma rede vascular com inúmeras fenestrações e aberturas no endotélio que permitem a passagem de partículas da circulação para o tecido. Assim, com o aumento do número de passagens de uma população de nanopartículas por uma região da rede vascular mais permeável, aumenta-se a probabilidade de estas acumularem no respectivo local. A este tipo de direccionamento dá-se o nome de *direccionamento passivo*. Para tal, os lipossomas mais usados são lipossomas de longo tempo de circulação, contendo polímeros como o PEG à sua superfície. Este polímero hidrossolúvel é geralmente adicionado na forma de lípido (1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino polietilenoglicol]) (DSPE-PEG, figura 3), com diferentes tamanhos do PEG (de 350 a 5000 Da)

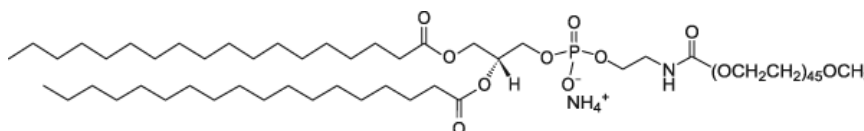


Figura 3: Estrutura química de 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀, AVANTI Polar Lipids®)

Allen e colegas demonstraram que lipossomas revestidos com PEG podem ser encontrados no sangue de ratinhos 24 h após a injeção praticamente na mesma concentração na qual foram injectados. Adicionalmente, a taxa de eliminação do organismo de lipossomas PEGilados é independente da dose injectada e é significativamente mais baixa em comparação com lipossomas convencionais.²⁷ A quantidade de PEG em relação aos lípidos totais da formulação não deverá exceder 10 % (mol/mol), para possibilitar o reconhecimento e interacção entre os lipossomas e membranas biológicas no local de acção.¹⁸

4.3. Direccionamento Activo

A abordagem do direccionamento passivo foi um grande passo na tentativa de maximizar a concentração do fármaco no local desejado, no entanto o longo tempo de circulação também leva a maior acumulação de nanopartículas em órgãos responsáveis

pela filtração do sangue como o baço e fígado. De modo a obviar ao máximo estes efeitos, as partículas têm de ser direccionadas activamente para as células alvo. Isto é, com ligandos específicos, capazes de serem reconhecidos pelas proteínas de membrana expressas apenas nas células afectadas. Esta estratégia tem sido um grande desafio para os investigadores e é um passo crucial para o desenvolvimento de nanomedicina.²⁸ Encontrar um receptor expresso apenas em células afectadas por uma certa doença, encontrar o ligando de maior afinidade para o mesmo e acoplá-lo a um nanosistema (de preferência, covalentemente) sem comprometer o seu reconhecimento são tarefas bastante complicadas. Não se pode esquecer que este sistema não pode ser reconhecido pelas defesas imunitárias do organismo, estando em circulação sistémica e, para poder ser comercializado, tem de ser bastante estável (mantendo o seu forte direccionamento) e muito bem caracterizado (composição lipídica, quantidade de fármaco incorporado, tamanho, potencial ζ e também a natureza e o número de ligandos de direccionamento). Para além disso, existe ainda a questão de passar de escala de bancada para a escala industrial, que é dos passos mais complicados a ultrapassar.

A interacção entre o ligando do nanosistema e o respectivo receptor tem de ser bastante eficiente, isto é, tem que ser altamente selectiva e impedindo a partícula de migrar para outros tecidos, uma vez reconhecida pelas células alvo. Quando se dá a ligação, o fármaco pode ser libertado de duas formas: libertação local do fármaco e difusão do mesmo através da membrana plasmática ou entrada do nanosistema intacto (por vias endocíticas diferentes) e libertação do fármaco no interior celular desencadeada por diferentes processos biológicos (por exemplo diminuição do pH no compartimento endossomal ou lisossomal).

O reconhecimento das partículas direccionadas pode ser conseguido de várias formas. As diferentes estratégias de direccionamento activo podem ser divididas em dois grandes grupos: uso de anticorpos ou uso de moléculas pequenas (epítomos de anticorpos, péptidos, oligossacáridos, ligandos de receptores específicos). De seguida serão discutidas três abordagens de direccionamento de nanopartículas mais usadas em biotecnologia: uso de anticorpos (imunolipossomas) e uso de pequenas moléculas

dando relevância aos dois casos estudados neste trabalho: péptidos e moléculas pequenas como o ácido fólico.

4.3.1. Direcçãoamento com Anticorpos

As primeiras tentativas de direcçãoamento activo, no tratamento de doenças oncológicas, envolveram o uso de anticorpos com afinidade para proteínas sobreexpressas em diferentes tipos de cancro. Por exemplo, a formulação do DOXIL® foi modificada de modo a conter um lípido covalentemente ligado ao anticorpo anti-HER2, conferindo-lhe assim, direcçãoamento para as células do cancro da mama e do ovário que sobreexpressam o receptor 2 do factor de crescimento da epiderme humano (HER2).²⁹ Outros anticorpos com afinidade para o factor de crescimento da epiderme (EGF), integrina, CD19, CD22, etc., foram estudados e testados *in vitro* e *in vivo*.³⁰⁻³²

Esta abordagem de preparação dos chamados *imunolipossomas* (ver Tabela 2) teve bastante interesse entre os investigadores;³³ no entanto algumas das desvantagens do uso de anticorpos no direcçãoamento levaram a procura de outras alternativas.³⁴ Sendo uma macromolécula, um anticorpo apresenta desvantagens na área de direcçãoamento tanto a nível de acoplamento aos lipossomas, bem como a nível da biodistribuição. A ligação covalente de uma macromolécula a uma estrutura tridimensional é um processo difícil de controlar, pois a modificação do anticorpo poderá alterar a sua estrutura terciária ou bloquear o epítipo, levando à diminuição da sua especificidade. Para além disso, sendo uma proteína, um anticorpo pode ser reconhecido pelas opsoninas do sangue, podendo ser fagocitado. A existência de antigénios em circulação (das células cancerígenas em metástase ou das proteínas membranares degradadas) é outro problema de especificidade que compromete o uso de anticorpos em nanopartículas aquando da injeção sistémica. Por outro lado, pequenos péptidos, factores de crescimento ou ligandos específicos são muito menos “visíveis” em circulação, na medida em que interagem menos com proteínas inespecíficas e, por outro lado, requerem uma integridade estrutural e funcional dos respectivos receptores, para serem reconhecidos. Esta vantagem possibilita o direcçãoamento para tecidos mal formados, como tumores sólidos onde as células expressam marcadores específicos e funcionais, explorando a hiperactividade das mesmas.

4.3.2. Direcçãoamento com Péptidos

O uso de péptidos como agentes de direcçãoamento tem sido bastante explorado, pois são compostos relativamente pequenos (até 20-30 resíduos de aminoácidos), fáceis de manipular, sendo também biocompatíveis³⁵. De entre inúmeros péptidos específicos para diversas células malignas, podem ser reconhecidos alguns padrões, como por exemplo péptidos com motivos RGD (arginina-glicina-aspartato), ou NGR (asparagina-glicina-arginina) com afinidade para integrinas expressas tanto em células tumorais, como em células do endotélio recém-formado ou para proteínas CD13 (aminopeptidase-N) sobreexpressas em células endoteliais tumorais.^{35,36} Existem ainda péptidos com duplas funções: a de direcçãoamento e de actividade antitumoral, como, por exemplo, antagonistas de HER2, pró-apoptóticos ou inibidores de metaloproteases de matriz.³⁷⁻³⁹

A grande vantagem de usar este tipo de moléculas é a sua versatilidade e facilidade de acoplamento a nanopartículas. A capacidade de acrescentar espaçadores de diferentes números de resíduos de aminoácidos ao domínio que lhe confere especificidade permite a sua ligação covalente a nanosistemas sem perder a capacidade de este interagir especificamente com o respectivo receptor.

Um péptido emergente (já na fase II de ensaios clínicos) com esta dupla função é o *Antagonista G* (*H-Arg-DTrp-N^{me}Phe-DTrp-Leu-Met-NH₂*) um hexapéptido com funções de antagonista de receptores de neurotransmissores em células do cancro do pulmão, nomeadamente na sua forma mais agressiva – SCLC.⁴⁰ A sua função de antagonista e de possível agente de direcçãoamento para este tipo de células foi explorada por um grupo da Universidade de Coimbra em colaboração com a Universidade de Alberta, Canada.^{41,42} O acoplamento covalente deste péptido à superfície dos lipossomas PEGilados contendo doxorubicina demonstrou resultados bastante promissores tanto em termos de internalização como em termos de citotoxicidade *in vitro* (testado em linhas celulares H82 e H69). Neste trabalho, o potencial de direcçãoamento do Antagonista G para as células H69 foi explorado, usando métodos alternativos de ligação aos lipossomas, descritos mais adiante (ver a secção de Resultados e Discussão – Ligação do Antagonista G aos lipossomas).

4.3.3. Direcçãoamento com pequenas moléculas

Como alternativa mais barata, mais fácil de isolar e sem necessidade de sintetizar *de novo*, surgem pequenas moléculas como oligossacáridos (e.g. ácido hialurónico⁴³) ou ácido fólico (Figura 4.a) como agentes de direcçãoamento. O ácido fólico é dos compostos mais explorados e usados para modificar nanopartículas com o objectivo de atingir especificamente as células que sobreexpressam o respectivo receptor.⁴⁴⁻⁴⁸

Os folatos (ácido fólico e seus derivados com diferentes estados de oxidação) pertencem à família de vitaminas B₉ e são muito importantes na síntese de ácidos nucleicos e na metilação de DNA e proteínas. Estes podem entrar para dentro da célula via canais aniónicos, com baixa afinidade (K_d entre 1 e 10 μM ⁴⁹), ou via receptores de folato (FR α , FR β e FR γ), glicoproteínas de membrana, ricas em resíduos de cisteína que se ligam aos folatos com uma elevada afinidade, $K_d < 1 \text{ nM}$.² O farmacóforo, ou seja, a parte da molécula responsável pela ancoragem ao receptor, compreende a região do ácido pteróico e uma parte do ácido L-glutâmico (até ao carboxilo α), possibilitando modificações no carboxilo terminal (posição γ) sem comprometer a afinidade (Figura 4.a e b)

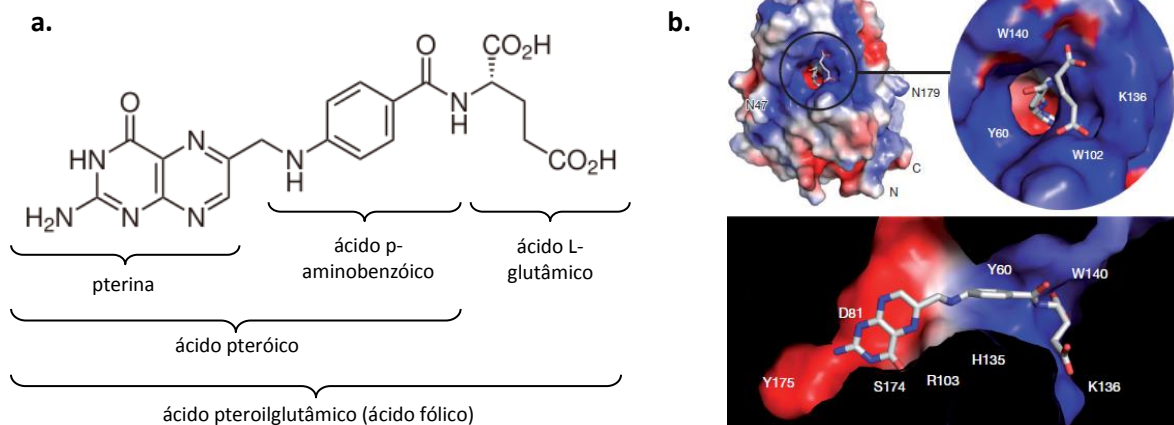


Figura 4: **a.** Estrutura química do ácido fólico; **b.** Estrutura 3D do complexo de receptor de folato, FR α -ácido fólico, resolvida por cristalografia de Raios-X (resolução 2,8 Å) (adaptado de ²)

Modificações no carboxilo α do ácido fólico levam à diminuição da sua internalização, pelo que o acoplamento desta molécula aos lipossomas tem de ser orientado para o carboxilo terminal.⁴⁷

A vantagem de se usar ácido fólico como ligando de direcção, está no facto de os receptores de folato serem expressos em níveis muito baixos nos tecidos saudáveis, aumentando apenas a sua expressão em situações muito particulares (e.g. células importantes no desenvolvimento embrionário: placenta e em células responsáveis pela reabsorção de folato nos rins). Quando a demanda pela síntese de macromoléculas de uma célula aumenta anormalmente, por exemplo, em células cancerígenas, a sobreexpressão de receptores de folato (principalmente FR α) é elevada a níveis que isolam estas células das restantes. Este fenómeno pode ser observado em tecidos malignos de ovário, endométrio (principalmente em adenocarcinomas), testículos, cérebro e, de forma menos frequente, em carcinomas de mama, cólon e rins.⁵⁰ Também há uma relação entre o baixo estado de diferenciação das células tumorais e elevados níveis de expressão de FR α , o que poderá também ser explorado para o direccionamento tendo como alvo células estaminais cancerígenas.

Na Figura 5 resume-se esquematicamente as características mais importantes acima discutidas a ter em conta no desenho de lipossomas para uso terapêutico, tendo em conta a dualidade captura pelo MPS vs o efeito de fuga.

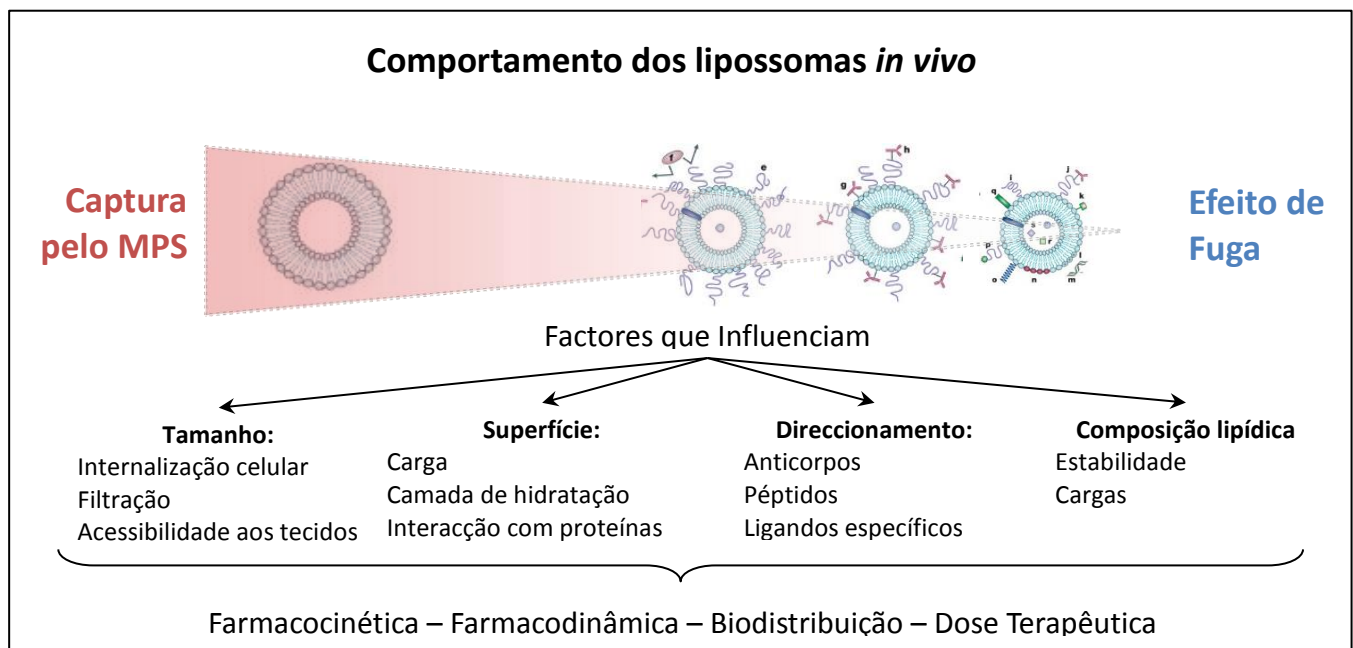


Figura 5: Diagrama explicativo dos diferentes factores que influenciam o comportamento de lipossomas *in vivo*, no que diz respeito à sua detecção pelo sistema mononuclear fagocitário (MPS)

5. Acoplamento de Antagonista G e Ácido Fólico à superfície de lipossomas

O primeiro desafio, dos acima mencionados, na produção de lipossomas activamente direccionados para células específicas no organismo e também explorado neste trabalho, está na ligação da molécula em questão à superfície de nanopartículas. Esta tem de ser quimicamente estável, não comprometer a integridade das partículas, tendo também flexibilidade suficiente para interagir com receptores das células alvo.

Vários estudos que comparam eficácias de internalização de lipossomas modificados directamente nos lípidos à sua superfície com lipossomas modificados na extremidade de moléculas espaçadoras, como o PEG, demonstraram a maior eficácia conferida pela flexibilidade dos espaçadores.^{51,52} Não só é importante o comprimento do espaçador, como também a densidade dos ligandos: uma densidade bastante elevada de ligandos à superfície do lipossoma torna mais difícil a sua internalização e, no caso de se tratar de péptidos, mais “visível” ao sistema imunitário.⁵³ A Figura 6 ilustra diferentes tipos de ligação de moléculas aos lipossomas.

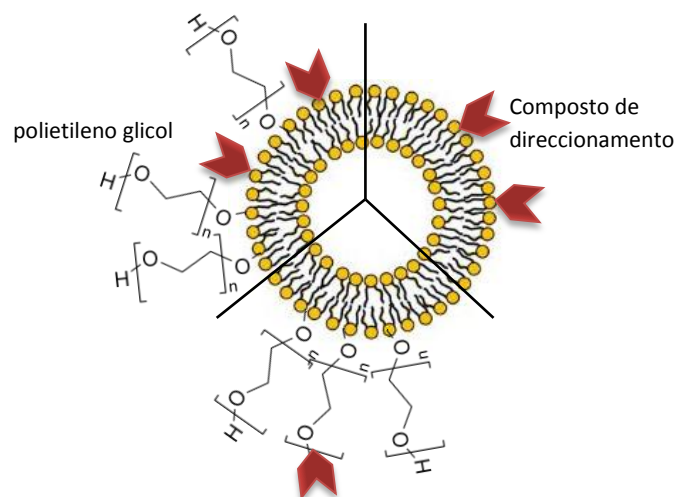


Figura 6: Diferentes possibilidades de ligação das moléculas que conferem especificidade a células alvo aos lipossomas

No caso de a ligação se efectuar directamente ao grupo polar dos fosfolípidos à superfície, o reconhecimento da mesma pelas células é relativamente eficaz. No entanto, como se trata de lipossomas não revestidos, o seu tempo de circulação é comprometido. Quando os mesmos lipossomas são revestidos por PEG, a camada de hidratação que se cria e os impedimentos estereoquímicos impossibilitam o reconhecimento da molécula, baixando a taxa de internalização das partículas para o interior celular. A melhor aproximação para o acoplamento é a ligação do composto à extremidade do PEG, por razões óbvias.

De um modo geral, existem três possíveis métodos de preparar lipossomas que apresentem moléculas específicas ligadas covalentemente ao PEG:

1. Método da inclusão do produto de síntese à mistura inicial dos lípidos (em clorofórmio). O lípido contendo PEG modificado com a molécula de interesse (adquirido ou previamente sintetizado) é adicionado à mistura inicial de lípidos, e os lipossomas são preparados seguindo o procedimento usual de hidratação do filme lipídico, seguido pela homogeneização de tamanhos das MLVs formadas (extrusão ou sonicação). A vantagem deste método está no facto de todos os lípidos adicionados serem incorporados na bicamada lipídica. Por outro lado, o arranjo e a orientação dos mesmos leva a que cerca de metade das moléculas de interesse estejam viradas para o interior hidrófobo dos lipossomas. Isto poderá ser desvantajoso quando se pretende encapsular compostos que possam reagir com o ligando utilizado, causando efeitos indesejados. Apesar disso, este é o método mais utilizado na preparação de lipossomas activamente direccionados.^{39,47,54}
2. O método de pós inserção é usado de modo a ultrapassar a desvantagem de haver ligandos no interior dos lipossomas. Este método consiste em formar micelas com o lípido conjugado com a molécula de interesse e incubá-las com lipossomas vazios. A entrada de lípidos das micelas (neste caso portam-se como tensoactivos) na bicamada fosfolipídica de lipossomas é favorecida termodinamicamente. A grande desvantagem deste método é a baixa eficácia do processo de inserção. Existem muitos factores importantes para o sucesso deste método: a suspensão lipossomal tem de estar acima da respectiva T_m , de

modo a possibilitar a entrada de lípidos adicionais na membrana; a concentração do lípido modificado tem de ser acima da respectiva concentração micelar crítica (implica um gasto adicional, o que é economicamente desvantajoso). De entre os três métodos, este foi reportado como o menos eficiente.⁵³ Por outro lado, o facto de ser necessário inserir um lípido na bicamada lipossomal previamente formada, este processo pode alterar o perfil de libertação dos compostos encapsulados tanto na bicamada como no espaço interno.

3. O método de ligação da molécula de interesse à superfície de lipossomas previamente formados, nomeadamente à extremidade do PEG, é o que apresenta maiores vantagens em termos de eficácia. No entanto, é o mais exigente em termos de execução. A ligação de moléculas aos lipossomas já formados tem de ser optimizada de modo a não interferir com a estrutura tridimensional da partícula, encontrar o grupo funcional imobilizado na extremidade do PEG (enquanto o ligando se encontra livre em solução) e evitar interacções inespecíficas com a superfície do lipossoma (importante na caracterização e no doseamento do composto acoplado). A ligação em fase heterogénea é comum na química de partículas sólidas (ouro e *quantum dots*) ou poliméricas.⁵⁵⁻⁵⁸ No entanto, a ligação a lipossomas não tem sido explorada como alternativa aos métodos acima descritos. Por esta razão, e pela sua maior eficácia em relação ao método anterior, a ligação de ácido fólico aos lipossomas pré-formados é o método escolhido neste trabalho para preparar lipossomas direccionados. Adicionalmente serão comparados os métodos 2 e 3 quanto a eficácia de ligação do antagonista G aos lipossomas formados.

5.1. Ligação covalente de Péptidos

A química de ligação de péptidos à superfície de lipossomas é bastante simples e bem estudada, uma vez que estes apresentam grupos funcionais com centros nucleófilos e electrófilos facilmente acessíveis. Para além disso, a possibilidade de adição de resíduos de aminoácidos tanto na zona C-terminal como na zona N-terminal de modo a não

INTRODUÇÃO

comprometer a afinidade do péptido para o respectivo receptor torna-os bastante apelativos e versáteis.

Ao contrário dos péptidos, as extremidades de PEG não são reactivas na mesma escala, pelo que as moléculas de PEG têm de ser funcionalizadas de modo a conferir especificidade e reactividade com os péptidos. As modificações mais comuns que se podem encontrar na literatura e na maioria dos fornecedores de lípidos modificados envolvem extremidades de PEG modificados com um grupo amina, N-hidroxisuccinimida (NHS), maleimida, (2-piridilditio)propionil (PDP) e metilo (Figura 6)^{39,42,57,59,60}

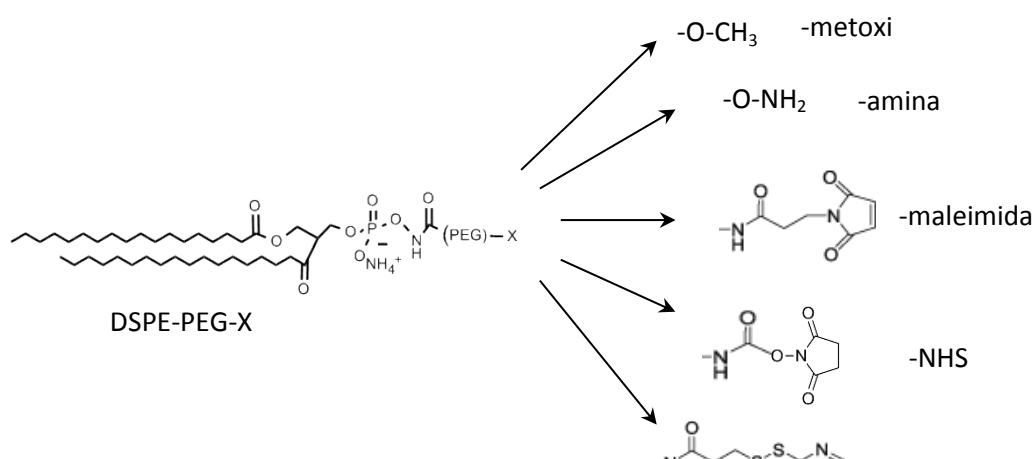


Figura 7: Diferentes derivados de 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-polietilenoglicol (DSPE-PEG), usado na ligação com diferentes moléculas

Cada grupo funcional de diferentes derivados de PEG é escolhido de acordo com a ligação que se pretende fazer à molécula de interesse. Os terminais *amina* são reactivos com centros electrofílicos, como os carbonos dos grupos carboxilo dos aminoácidos; os grupos *maleimida* são normalmente empregues na ligação com grupos sulfidrilo de resíduos de cisteína ou de outros tióis que podem ser adicionados *a posteriori* aos péptidos sintetizados; o grupo *NHS* (na forma de éster), sendo um bom grupo abandonante, apresenta uma elevada reactividade com centros nucleófilos, como os átomos de azoto das aminas primárias dos aminoácidos; o grupo *PDP* contém uma ligação persulfureto que, após redução, apresenta elevada reactividade com os grupos maleimida.

De entre as ligações apresentadas, a mais usualmente empregue é a ligação entre DSPE-PEG funcionalizado com um grupo maleimida e um grupo sulfidrílo de resíduos de cisteína (normalmente adicionadas a uma das zonas terminais) dos péptidos. Uma vez que, em solução aquosa, a oxidação de resíduos de cisteína ou outros tióis para formar ligações persulfureto é um processo relativamente rápido e pode comprometer o rendimento da ligação com maleimida, é necessário usar agentes redutores como ditioneitol (DTT) ou 2-mercaptoetanol antes da ligação propriamente dita. Uma nova classe de agentes redutores, as fosfinas, nomeadamente Tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP) (Figura 8) são mais apelativos como agentes redutores devido ao facto de não possuírem átomos de enxofre, apresentando uma baixa selectividade para grupos maleimida (até uma certa concentração).⁶¹

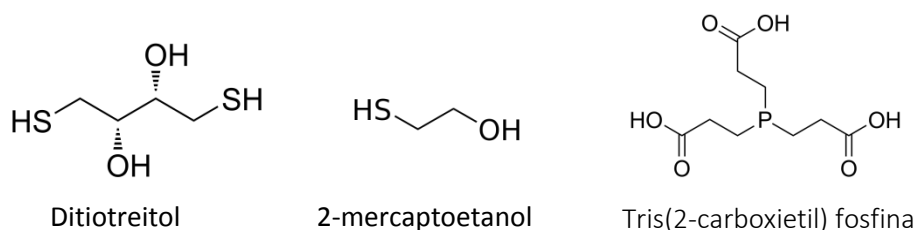


Figura 8: Estruturas químicas de compostos mais usados na redução de ligações persulfureto de proteínas, péptidos e outras moléculas com grupos sulfidrílo

5.2. Ligação covalente de Ácido Fólico

Como já foi referido, ácido fólico é das moléculas mais utilizadas no direccionamento de sistemas de entrega para locais de tumor. A produção de lipossomas com esta molécula à superfície envolve mais passos e é mais exigente do ponto de vista da química da ligação do que o acoplamento de péptidos a estas partículas.

Na literatura, foram descritos vários passos que envolvem o acoplamento desta molécula à extremidade do DSPE-PEG funcionalizado. De um ponto de vista geral, todas estas técnicas apresentam dois passos em comum: activação do ácido fólico, de modo a conferir-lhe reactividade com o grupo funcional do DSPE-PEG e ligação desta molécula activada ao respectivo lípido.^{46,47,62}

Neste trabalho a ligação do ácido fólico aos lipossomas foi baseada no procedimento descrito por Chan e colegas,⁵⁶ devido ao facto de se utilizar a química de ligação entre um grupo sulfidrílo (adicionado ao ácido fólico) e um grupo maleimida (ver secção de materiais e métodos). Esta ligação é muito usada na marcação de proteínas com sondas fluorescentes (grupos sulfidrílo de cisteínas e sondas modificadas de modo a ter grupos maleimida), bem como na ligação a nanopartículas, como já foi referido. Os grupos maleimida não ocorrem naturalmente em biologia, pois são bastante reactivos e selectivos para tióis reduzidos, o que justifica a sua escolha como agentes de ligação. A química de ligação está descrita com maior detalhe na secção de Resultados e Discussão.

6. Endocitose de nanopartículas

O processo endocítico é bastante importante na manutenção da homeostasia da célula. Por este processo a célula recebe selectivamente os nutrientes, mantem a circulação e renovação de lípidos de membrana e, em geral, possibilita a comunicação da célula com o seu espaço envolvente. Com o desenvolvimento de técnicas de microscopia electrónica, fluorescência em tempo real e tratamento de imagens foi possível identificar vários tipos de endocitose em células animais. De facto, existem muitas vias distintas de endocitose, com os principais intervenientes identificados, no entanto, ainda há bastantes limitações na interpretação e explicação molecular das vias de internalização de moléculas e partículas no interior celular.

Cerca de uma dezena de diferentes vias endocíticas foram identificadas em células animais, muitas das quais coexistem na mesma célula. A tabela 5 apresenta seis dos mecanismos mais estudados.^{63,64}

Tabela 4: Diferentes tipos de endocitose identificados em células animais

Mecanismo	Morfologia	Carga associada
Mediado pela Clatrina	Vesicular	RTKs, GPCRs, Receptor de Transferrina
Mediado pela Caveolina	Vesicular/Túbulo-vesicular	Proteínas ligadas a GPI
Independente da Clatrina	Tubular/ Em anel	Líquidos, Proteínas ligadas a GPI
Mediado pela Flotilina	Vesicular	Proteoglicanos
Fagocitose	Forma da respectiva carga	Patógenos, resíduos de apoptose
Macropinocitose	Irregular	Líquidos, RTKs

RTK: receptores de tirosina cinase; GPCR: receptores acoplados a proteína G; GPI: glicosilfosfatidilinositol

Com o desenvolvimento de biotecnologia e nanomedicina, o estudo de biodistribuição, internalização e biocompatibilidade intracelular de nanopartículas tem-se tornado cada vez mais emergente. O uso de nanopartículas para a entrega de fármacos ou diagnóstico compreende sistemas com tamanhos e características físico-químicas bastante heterogêneos. Em geral, foi comprovado que partículas de tamanhos mais reduzidos (20 - 80 nm) e carregadas positivamente são internalizadas mais rapidamente por células humanas em monocamada.⁶⁵

A endocitose de nanopartículas tem de ser analisada do ponto de vista da natureza das mesmas. Estas podem ser divididas em partículas rígidas, como nanopartículas de ouro, *quantum dots* ou nanotubos de carbono e nanopartículas flexíveis, como sistemas vesiculares, micelares poliméricos. Devido à baixa tensão superficial de partículas flexíveis, a sua interação com estruturas biológicas é mais facilitada, por outro lado nanopartículas rígidas, por apresentarem uma interface sólido-líquido bem definida, muitas das vezes apresentam-se como tóxicas ao organismo.⁶⁶

Vários estudos indicam que a internalização de lipossomas em células humanas (como HeLa, HEK ou J774) passa pela ligação dos mesmos à membrana plasmática, seguida da sua internalização através da formação de invaginações revestidas por várias proteínas responsáveis pela endocitose^{65,67}. Esta área ainda está pouco explorada e mecanismos concretos, como os tipos de receptores envolvidos ou o tipo de vesículas formadas na endocitose de lipossomas ainda estão por definir. A endocitose de nanopartículas não segue, em geral, sempre a mesma via e foram encontradas provas de tipos de vias

preferenciais para internalizar partículas dependentes do tipo de célula. Por exemplo, em diferentes casos do cancro da próstata a internalização e tráfego intracelular de *quantum dots* dá-se de formas bastante divergentes, apresentando níveis e localizações bastante distintas das mesmas partículas.⁶⁸ Por outro lado, é também expectável encontrar diferentes vias de internalização do mesmo tipo de partículas na mesma célula. Por exemplo, no caso de células polarizadas (células epiteliais ou endoteliais) o mecanismo predominante no lado basolateral é a endocitose mediada pela caveolina e no lado apical podem ser encontrados vários mecanismos independentes da clatrina⁶⁹. Por estas razões, a endocitose de partículas tem de ser vista tendo em conta o fenótipo das células alvo, pois o mecanismo de internalização preferencial estará bastante dependente dos níveis de proteína responsável pela endocitose (por exemplo, clatrina ou caveolina) e até, no caso de células polarizadas, do lado da célula em que se dá o reconhecimento da partícula.

6.1. Endocitose mediada por Clatrina

A clatrina é uma proteína oligomérica, composta por três cadeias pesadas e três leves. Esta proteína é recrutada para domínios membranares que recebem um estímulo do exterior que desencadeia este tipo de endocitose. Ao ligar-se à membrana (por meio de várias proteínas adaptadoras) as moléculas de clatrina formam uma rede polimérica que força a membrana a sofrer uma curvatura para o interior, levando consigo o composto a endocitar. Forma-se uma vesícula revestida por esta proteína, que se dissocia assim que a vesícula é fechada (por meio de acção da dinamina), desta forma possibilitando o seu transporte e fusão com outros compartimentos intracelulares.

As vesículas endocíticas revestidas por clatrina têm diâmetros na ordem de 100 a 200 nm.⁶⁴

6.2. Endocitose mediada por Caveolina

Durante algum tempo era aceite que a endocitose mediada pela clatrina era o único processo de endocitose existente nas células, até uma outra proteína de membrana responsável pela internalização de componentes extracelulares, a caveolina, ter sido identificada.⁶⁵ A caveolina é uma proteína transmembranar, associada directamente ao colesterol da membrana plasmática. Existem três tipos de caveolina: caveolina 1, 2 e 3,

dependendo da sua distribuição em diferentes tecidos.⁶⁴ A estrutura tridimensional destas proteínas envolve segmentos hidrófobos em hélice- α posicionados juntamente com o colesterol e certos lípidos de membrana (constituintes das jangadas lipídicas), de modo a aumentar o espaçamento entre os lípidos da camada interna, diminuindo o espaçamento na camada externa da membrana plasmática.⁷⁰ Desta forma, a parte superior da membrana está na fase fluida – ordenada, L_0 , devido aos esfingolípidos e colesterol, enquanto a parte interior encontra-se na fase fluida, devido à acção da caveolina e outras proteínas de membrana. Estas proteínas são encontradas em muitas cascatas de transdução de sinal e, em geral, são de três tipos: proteínas ancoradas a membrana (via GPI), proteínas transmembranares e proteínas duplamente aciladas, como as Src cinases. Esta interacção da caveolina com as proteínas de sinal confere-lhe uma função bastante importante na sinalização, para além da sua função específica no mecanismo de endocitose.

6.3. Endocitose mediada por receptores de Folato

Os receptores de folato são proteínas ancoradas à membrana plasmática via GPI, sem possuir domínios citosólicos de interacção com outras proteínas. A endocitose de folatos via estes receptores tem sido alvo de muitos estudos e parece ainda não haver um conhecimento detalhado do mecanismo envolvido na sua internalização.⁷¹ Existem fortes evidências que associam estes receptores ao mecanismo mediado pela caveolina.⁷² Num estudo conduzido por Ritter e colegas, células contendo receptores de folato modificados de modo a apresentar domínios citosólicos com afinidade para clatrina demonstraram uma internalização bastante deficiente desta vitamina, em contraste aos receptores *wild type*.⁷³ No entanto, independentemente do conhecimento detalhado da via endocítica responsável pela entrada de folatos, as informações sobre a ligação do folato ao seu receptor, o tráfego intracelular, a libertação do respectivo ligando e a reciclagem do receptor para a membrana plasmática podem ajudar bastante na escolha da dose e frequência do tratamento com nanopartículas direccionadas.

6.4. Trafego intracelular de nanopartículas

O destino intracelular de nanopartículas tem sido objecto de muitos estudos para melhorar a entrega de fármacos a alvos específicos intracelulares. No entanto, as técnicas existentes para atingir este objectivo não são suficientemente poderosas para se obter resultados precisos.⁶⁵ É frequente o uso de inibidores específicos dos passos de certas vias endocíticas para estudar as vias de internalização de partículas marcadas. No entanto, as diferentes alternativas e o intercruzamento destas vias, torna os dados pouco viáveis. A recorrência à microscopia confocal na tentativa de co-localizar partículas fluorescentes com vesículas endocíticas marcadas também é frequente nesta área. O limite de resolução desta técnica frequentemente leva a dados inconclusivos ou até erróneos no que diz respeito ao destino intracelular de nanopartículas. É muito frequente usar marcação de endossomas primários, tardios ou lisossomas com diferentes marcadores para estudar a localização intracelular de nanosistemas. O facto de estas estruturas não se encontrarem em espaços confinados da célula e estarem presentes no mesmo instante, torna a visualização bastante complicada. Como alternativa, a microscopia electrónica fornece resultados mais rigorosos para este tipo de estudo.⁷⁴

O destino final das partículas endocitadas são os lisossomas (fusão dos endossomas tardios com lisossomas), exceptuando os casos de transcitose em células endoteliais ou epiteliais. Este facto pode ser um grande obstáculo à entrega de macromoléculas que não podem ser degradadas, como os ácidos nucleicos. Por outro lado, pode ser explorado como um aliado à libertação do fármaco no interior celular. Existem duas estratégias actualmente empregues para evitar a degradação lisossomal do fármaco: libertação do conteúdo causado pela destabilização da membrana endossomal/lisossomal ou disrupção total do lisossoma. Em ambos os casos a diminuição do pH é explorada como fenómeno que desencadeia a libertação. Na primeira abordagem, é comum usar-se péptidos, ou, no caso de lipossomas, lípidos fusogénicos para interagir com a membrana do respectivo organelo. Por exemplo, péptido fusogénico pHLIP® (pH Low Insertion Peptide) foi utilizado em lipossomas e testado em células HeLa e células de carcinoma do pulmão, A549, mostrando resultados promissores. Com a diminuição do pH este péptido de 36 resíduos de

aminoácidos forma estruturas hidrófobas em hélice- α , inserindo-se na membrana endolisossomal, causando a sua disrupção.⁵⁹ Por outro lado, existem lípidos aniônicos, como o DOPE (ver Tabela 2) que também exploram o ambiente ácido dos endossomas. Ao serem protonados, o seu grupo polar adquire um carácter neutro, diminuindo as repulsões entre lípidos adjacentes. Como resultado, a estrutura lamelar dos lipossomas passa espontaneamente para estrutura hexagonal, libertando o conteúdo do lipossoma e rompendo a membrana do endossoma (Figura 9).²⁰

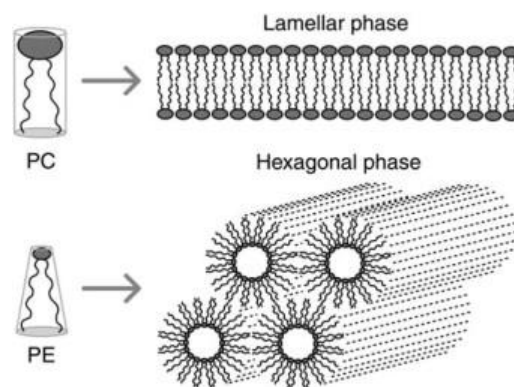


Figura 9: Diferentes fases da bicamada fosfolipídica e a sua dependência do diâmetro hidrodinâmico do grupo polar dos fosfolípidos

A segunda abordagem emprega o efeito de “proton sponge” de certos polímeros para romper a membrana lisossomal. Polímeros como a polietilenoimina (PEI), possuem monómeros com grupos protonáveis. Em ambiente ácido (lisossomas) a protonação deste polímero resulta na entrada de grandes quantidades de água para o seu interior, causando lise e libertação do respectivo conteúdo para o citosol.⁷⁵

II. OBJETIVOS

Objectivos

O trabalho efectuado teve como principal objectivo a optimização do processo de preparação de lipossomas de longo tempo de circulação, direccionados através de um ligando específico para as células tumorais. O processo de optimização passou pela escolha de um ligando com elevada afinidade para um marcador tumoral (expresso na membrana plasmática), a sua ligação covalente aos lipossomas e a observação da internalização pelas células tumorais das nanopartículas preparadas.

Neste trabalho, escolheu-se ácido fólico como agente de direccionamento de lipossomas, devido à sua elevada afinidade para receptores de folato os quais estão sobreexpressos em células de uma grande variedade de tumores mas praticamente ausentes em tecidos saudáveis. Com o objectivo principal de desenvolver um método simples e único de acoplamento a lipossomas pré-formados, desenvolveu-se um procedimento de ligação covalente do ácido fólico às extremidades de polietileno glicol localizado na bicamada exterior dos lipossomas. Este método não foi encontrado na literatura até à data e consiste num verdadeiro desafio do ponto de vista químico (síntese orgânica), termodinâmico (manutenção da integridade tridimensional dos lipossomas) e bioquímico (capacidade de reconhecimento do ácido fólico pelos respectivos receptores e a possibilidade da sua internalização celular).

Adicionalmente, procedeu-se também à ligação aos lipossomas do péptido *Antagonista G* ($H\text{-Arg-DTrp-N}^{me}\text{Phe-DTrp-Leu-Met-NH}_2$), como ligando selectivo para uma variedade de receptores de neuropeptídeos (com funções de factores de crescimento) sobreexpressos em células do cancro do pulmão, nomeadamente Carcinoma de Células Pequenas de Pulmão (*Small Cell Lung Carcinoma, SCLC*). Estudou-se comparativamente dois métodos de ligação do péptido aos lipossomas: método de pós inserção de DSPE-PEG₂₀₀₀-Antagonista G e o método de ligação directa aos lipossomas previamente formados.

Com a preparação destes sistemas direccionados pretende-se atingir elevados níveis de internalização de lipossomas em células específicas que apresentem os respectivos receptores na sua membrana plasmática, comparativamente a lipossomas não

OBJECTIVOS

direccionados. Assim, testou-se a internalização de lipossomas não direccionados e direccionados com ácido fólico em células HeLa e MCF7 (as primeiras sobreexpressam receptores de folato (FR α), contrariamente às segundas), bem como a internalização de lipossomas direccionados com antagonista G no modelo celular de SCLC, a linha H69. Para tal, a técnica de microscopia de fluorescência foi usada para visualizar a internalização de lipossomas marcados com rodamina (na bicamada lipídica sob a forma de lípido: N-lissamina B sulfonil Rodamina ligada a fosfatidiletanolamina da lecitina de ovo, *PE-Rhod*).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

1.1. Reagentes

A fosfatidilcolina de ovo (EPC) e fosfatidiletanolamina PEGilada com PEG de 2000 Da (DSPE-PEG₂₀₀₀) foram adquiridas à Lipoid GmbH (Alemanha). O colesterol foi adquirido à Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, EUA). O lípido funcionalizado com maleimida (DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida) e o lípido conjugado com ácido fólico (DSPE-PEG₂₀₀₀-AF) provieram de NanoCS Inc. (EUA). A fosfatidiletanolamina de ovo marcada com lissamina rodamina B (PE-Rhod) foi adquirida à Avanti Polar Lipids (Alabama, EUA). Os reagentes para a activação do ácido fólico: ácido fólico, N-hidroxisuccinimida (NHS), diciclohexil carbodiimida (DCC), 2-aminoetanotiol (cisteamina) e trietilamina (TEA) foram adquiridos à Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, EUA). O DMSO usado na síntese química proveio da Merck Millipore (Alemanha). O hexapéptido antagonista G foi sintetizado no Alberta Peptide Institute (Edmonton, AB, Canada), com uma pureza de 95 % e o reagente para a sua tiolação, 2-iminotiolano-HCl (reagente de Traut) foi adquirido à Fluka (Buchs, Suíça). As colunas de cromatografia de exclusão molecular Econo-Pack® 10 DG foram adquiridas à Bio-Rad Laboratories (EUA). As placas de sílica para a cromatografia em camada fina, revestidas com *Silica Gel G-60 F254* foram adquiridas à Merck Millipore (Alemanha).

Os meios de cultura de células DMEM e RPMI-1640, tripsina com EDTA 0,2 % (m/v), penicilina-streptomicina, L-glutamina, tampão de fosfatos para a lavagem de células (DPBS sem Ca²⁺ nem Mg²⁺, estéril) e soro (FBS) foram adquiridos à Thermo Fisher Scientific, Inc. (Utah, EUA). A sonda fluorescente específica para núcleos, 4',6-diamidino-2-phenilindole (DAPI) proveio do Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

O kit de extracção de RNA (TRI Reagent®) proveio de Sigma Chemical Co. St Louis Mo (EUA). O kit de síntese de cDNA a partir do RNA extraído (*RevertAid H minus Reverse Transcriptase*, Fermentas) e a mistura de padrões de DNA, *GeneRuler DNA Ladder Mix* foram adquiridos à Thermo Fisher Scientific, Inc. (Utah, EUA). O kit de PCR (*Taq DNA polimerase*) foi adquirido a Invitrogen (USA). A agarose para o gel de electroforese (*DNA Grade Agarose, Electren®*) proveio de VWR International BVBA (Bélgica). O reagente

Green Safe usado na electroforese de ácidos nucleicos foi adquirido a NZYTech®, Lda (Lisboa, Portugal).

Os restantes reagentes e solventes utilizados eram de grau analítico.

1.2. Células

As linhas celulares de cancro cervical (HeLa, CCL-2), adenocarcinoma da mama (MCF7, HTB-22) e modelo clássico do cancro do pulmão, SCLC (H69, HTB-119) são da American Type Culture Collection. As células aderentes (HeLa e MCF7) foram cultivadas em placas de Petri de 90 mm em meio DMEM, suplementado com FBS a 10 % (v/v) inactivado por calor, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de streptomicina e L-glutamina 2 mM. As células em suspensão (H69) foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm², em meio RPMI-1460, suplementado da mesma forma que o meio DMEM.

As células foram mantidas na estufa a 37 °C sob atmosfera humidificada (90 % humidade), com 5 % de CO₂.

2. Métodos

2.1. Preparação de lipossomas direccionados com ácido fólico

O ácido fólico foi activado com um grupo sulfidrilo, e ligado aos lipossomas contendo DSPE-PEG-maleimida. A activação do ácido fólico seguiu um processo síntese química de dois passos, seguido da ligação aos lipossomas preparados por método de hidratação de filme lipídico e dimensionados por processos de extrusão.

2.1.1. Activação do ácido fólico com um grupo sulfidrilo

O ácido fólico foi activado usando o procedimento descrito por Chan e colegas⁵⁶, com algumas modificações relevantes para o estudo em questão, quer em termos de quantidades, quer de técnicas utilizadas. Em resumo, 2 mL de DMSO foram adicionados a 0,05 g de ácido fólico num balão de fundo redondo envolvido com papel de alumínio. Agitou-se a mistura com a ajuda de um agitador magnético durante a noite de modo a dissolver completamente o composto adicionado. Posteriormente adicionaram-se 25 µL

de trietilamina (TEA) e deixou-se a mistura em repouso durante 30 minutos de modo a equilibrar com o ácido fólico dissolvido. De seguida, adicionaram-se 0,025 g de diciclo hexilo carbodiimida (DCC) e 0,026 g de N-hidroxisuccinimida (NHS) e deixou-se a mistura a agitar durante a noite (o mecanismo detalhado da reacção está discutido na secção de Resultados e Discussão). Após 18 h de incubação, filtrou-se a mistura com a ajuda de uma seringa e um filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 μm de diâmetro de poro. A mistura no balão foi montada no evaporador rotatório *Rotavapor RE-111, Buchi, Suíça*, de modo a evaporar a TEA presente em solução (37 $^{\circ}\text{C}$).

Num estudo preliminar estudou-se a evaporação completa do DMSO com a ajuda do evaporador rotatório, de pressão controlada *Rotavapor B-481, Buchi, Suíça*. Após a evaporação completa do solvente (cerca de 1 h a 420 mBar e a 70 $^{\circ}\text{C}$), observou-se a hidratação da solução. Por este motivo, e devido às condições extremas que requer, o processo foi abandonado optando-se apenas por evaporar a TEA da solução.

Após a evaporação da TEA, transferiu-se a mistura para um tubo de plástico de 5 mL com tampa de rosca, de modo a minimizar a quantidade de ar presente no recipiente e adicionaram-se, de novo, 25 μL de TEA, renovando-a na mistura reaccional. De seguida, adicionou-se 2-aminoetanotiol (cisteamina) à solução, na razão molar de 1:1, em relação ao ácido fólico presente e deixou-se a reacção de substituição ocorrer durante a noite sob agitação orbital.

2.1.2. Caracterização do processo de activação do ácido fólico

O método de activação do ácido fólico tem vários passos críticos, cuja realização é crucial para o sucesso desta síntese. A monitorização deste processo foi efectuada por diversos métodos físico-químicos, descritos a seguir.

2.1.2.1. Identificação de AF-NHS por hidrólise alcalina

A presença de AF-NHS após a reacção de esterificação com NHS foi avaliada espectrofotometricamente, medindo a absorvência a 260 nm. NHS em solução alcalina apresenta um elevado coeficiente de absorção molar ($\epsilon_{260\text{nm}} = 9700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)⁷⁶ que é bastante reduzido quando esta molécula se encontra ligada por uma ligação éster a outro composto. Os ésteres de NHS são extremamente lábeis a pH elevado, pelo que a sua dissolução numa solução aquosa com pH alcalino leva à sua hidrólise completa em

alguns minutos. Após incubação do ácido fólico com NHS e DCC, na presença de TEA durante 18 h, retirou-se uma alíquota e diluiu-se esta 2500 vezes em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0, medindo-se imediatamente a absorvência da solução (a diluição foi escolhida por tentativa e erro até a amostra apresentar uma absorvência inferior a 0,500 a 260 nm). Após a adição de 30 µL de NaOH 0,1 M e uma incubação de cerca de 10 min, voltou-se a ler a absorvência da amostra, na tentativa de observar um aumento do sinal, devido à libertação de NHS após a hidrólise do respectivo éster.

As medidas de absorvência foram feitas contra o tampão citrato acima referido onde a amostra foi diluída.

2.1.2.2. *Optimização da técnica de cromatografia em camada fina (TLC) para a identificação de derivados de ácido fólico*

A reacção de activação do ácido fólico foi seguida por TLC, de modo a identificar a presença de novos produtos e o desaparecimento dos compostos de partida. A fase estacionária não foi optimizada, pelo que se usaram sempre placas de sílica G-60, F254, mudando-se apenas a fase móvel. As misturas da fase móvel para a optimização da separação do ácido fólico e seus produtos dos restantes reagentes basearam-se em estudos anteriores.^{77,78}

Em diferentes alturas da síntese (após a reacção do ácido fólico com NHS e após a reacção do éster formado com cisteamina) foram retiradas alíquotas de 10 µL da mistura reaccional e dissolvidas em metanol:água (3:1, v/v). As amostras foram aplicadas em placas de sílica com a ajuda de uma pipeta P-10, aplicando-se 5 µL. As placas foram eluídas com 15 misturas diferentes (

Tabela 5) numa câmara previamente saturada com o vapor das respectivas fases móveis. Após a eluição, as placas foram visualizadas sob uma lâmpada de UV.

Para a análise das amostras por TLC escolheu-se a mistura nº 15, por ser esta a que apresentava a melhor separação dos compostos.

Tabela 5: Diferentes misturas de solventes preparadas para usar como fase móvel na separação de diferentes derivados de ácido fólico por cromatografia em camada fina (TLC)

Razões Volumétricas	H ₂ O	Etanol 70 % (v/v)	Metanol	Ácido acético	Acetona	Amónia	Clorofórmio	Butanol
1	1	2	0	0	0	0	0	0
2	3	0	18	0	0	0	38	0
3	3	0	18	1	0	0	38	0
4	3	0	18	2	0	0	38	0
5	0	3	0	0	9	1	0	0
6	0	2	0	0	4	1	0	0
7	0	2	0	0	2	1	2	0
8	0	3	0	0	3	1	0	0
9	0	3	0	0	3	0	0	0
10	0	2	0	0	2	0.1	2	0
11	0	9	0	0	3	1	0	0
12	0	4	0	0	2	1	0	0
13	1	0	0	5	0	1	4	7
14	0	3	0	0	9	1	0	0
15	0	3	0	0	7	1	0	0

2.1.2.3. Doseamento de tióis totais pelo método de Ellman

Após a reacção de activação do ácido fólico, a presença de grupos sulfidrilo foi doseada recorrendo ao método de Ellman.⁷⁹ Em resumo, retirou-se uma alíquota de 10 µL da mistura reaccional e adicionou-se a 2,4 mL de tampão Tris-HCL 0,4 M, pH 8,9, de seguida adicionou-se mais mais 90 µL de tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0 e 20 µL de 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico 20 mM (DTNB, Reagente de Ellman). Este reagente foi preparado na concentração de 20 mM em 10 mL de metanol e usado directamente para realização do teste. Adicionalmente, prepararam-se dois brancos: uma solução contendo a amostra (10 µL da mistura reaccional e 90 µL de tampão citrato), sem o reagente de Ellman (20 µL de metanol) em tampão tris-HCL 0,4 M, pH 8,9 e outra solução contendo o reagente de Ellman (20 µL), sem se adicionar a amostra (100 µL de tampão citrato) em tampão tris-HCL 0,4 M, pH 8,9.

A quantificação da concentração de grupos sulfidrilo em solução foi feita pela leitura de absorvência a 412 nm. A espécie que se forma após a reacção com os tióis reduzidos em solução apresenta um coeficiente de absorção molar elevado a este comprimento de onda (Figura 10), em soluções alcalinas ($\epsilon_{412\text{nm}} = 13100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para soluções salinas concentradas e $\epsilon_{412\text{nm}} = 14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para soluções salinas diluídas).⁷⁹⁻⁸¹ Para a quantificação usou-se o ϵ para soluções salinas diluídas.



Figura 10: Esquema da reacção de um tiol com o 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB)

2.1.2.4. Perfil de eluição do ácido fólico

Previamente à ligação aos lipossomas a mistura reaccional foi testada quanto à possibilidade de separação dos reagentes por cromatografia de exclusão molecular (nomeadamente separar a cisteamina do ácido fólico, uma vez que esta possui grupos sulfidrílo que podem interferir na ligação com os lipossomas).

Preparou-se uma solução de cisteamina em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0 a uma concentração de 60 mM e uma solução de DMSO em tampão citrato (10 % V/V) das quais foram traçados espectros de absorção no intervalo de 200 a 400 nm. Os picos de absorção máxima de cada espécie foram identificados e usados nas leituras de absorvência para traçar o perfil de eluição da mistura reaccional.

Retirou-se uma alíquota de 100 µL da mistura reaccional e diluiu-se de 1/10 em tampão citrato. Aplicou-se 1mL da amostra diluída na coluna Econo-Pac® 10 DG (limite de exclusão de 6000 Da) e foram recolhidas amostras de 0,5 em 0,5 mL com a eluição efectuada com o mesmo tampão (citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0). Foi medida a absorvência a 250 nm (pico de absorção do DMSO), a 285 nm (pico de absorção da cisteamina) e a 360 nm (segundo pico de absorção do ácido fólico) das amostras eluídas, de modo a traçar os respectivos perfis de eluição.

2.1.2.5. Optimização do doseamento do ácido fólico

A solução *stock* de ácido fólico foi preparada em NaOH 1 M, a uma concentração de 100 mM. Para o doseamento por espectrofotometria de absorção, foram preparadas diluições de 20, 40, 60, 80 e 100 µM a partir da solução *stock* em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0. Leituras de absorvência efectuadas usando espectrofotómetro Simadzu UV-160A na gama de comprimentos de onda de 260 a 500 nm, com intervalos de leitura de 20 nm.

Para o doseamento por espectroscopia de fluorescência, foram preparadas diluições de 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10 μM às quais foram adicionados lipossomas de longo tempo de circulação, lípido a 20 mM e triton X-100 a 20 % (v/v) na razão volumétrica de 5:3. A concentração final de lípido era de 2 mM e de triton X-100, 1,2 % (v/v). Adicionalmente preparou-se uma solução de ácido fólico 1 μM , em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0, adicionando-se lipossomas para uma concentração final de 2 mM de lípido, sem a adição do detergente. Esta solução serviu para avaliar os efeitos de dispersão da luz nas propriedades de fluorescência do ácido fólico. Foram traçados espectros de excitação e de emissão das soluções preparadas, usando o espectrofluorímetro *Spex Fluorolog-3 v 2.2, HORIBA, Jobin Yvon (Kyoto, Japão)*. Os espectros de excitação e de emissão foram traçados com os respectivos comprimentos de onda de emissão a 445 e de excitação a 360 nm. As larguras das fendas dos monocromadores de excitação e de emissão foram de 5 nm neste equipamento.

2.1.3. Preparação de lipossomas

No estudo da ligação do ácido fólico aos lipossomas, foram preparadas duas formulações diferentes: lipossomas de longo tempo de circulação não direccionados e lipossomas de longo tempo de circulação contendo DSPE-PEG-maleimida para a reacção com o grupo sulfidrílo do derivado de ácido fólico após a sua activação (AF-SH), segundo o método de hidratação do filme lipídico e dimensionados por extrusão sequencial até um tamanho de poro final de 0,10 μm .

Para tal, dissolveu-se em clorofórmio uma mistura de EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀ na razão molar de 68,25:30,5:1,25, no caso de lipossomas não direccionados e EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida na razão molar de 68,25:30,5:0,55:0,7, no caso dos lipossomas para a ligação do ácido fólico-SH. O solvente foi evaporado à secura no evaporador rotativo (*Rotavapor RE-111. Buchi, Suíça*), de modo a formar um filme lipídico. Este foi hidratado com tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0 para uma concentração lipídica final de 20 mM, com agitação e ajuda de esferas de vidro. As vesículas formadas (MLV) foram extrusadas com o extrusor *Lipex™ Thermobarrel Extruder* passando sequencialmente vez por filtros (Nucleopore® Track-Etched

Membranes Whatman[®], EUA) de 600, 400 e 200 nm de diâmetro de poro e 3 vezes pelo filtro de 100 nm.

2.1.4. Ligação do AF-SH aos lipossomas

Após a activação do ácido fólico, preparou-se uma solução *stock* de tris-2-carboxietil fosfina (TCEP) a 100 mM em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0. Este reagente é amplamente usado como alternativa a ditioneitol ou 2-mercaptoetanol na redução de ligações persulfureto, por ser inodor e não conter átomos de enxofre na sua estrutura química. A dissolução deste reagente foi feita num volume de tampão inferior ao volume final da solução a preparar, uma vez que este reagente acidifica bastante o meio. Após a dissolução, ajustou-se o pH para aproximadamente um valor de 7 (com a ajuda de papel indicador de pH), adicionando gota a gota uma solução de NaOH 0,1 M. O TCEP foi adicionado à mistura reaccional de ácido fólico para a activação na proporção de 1:1,3 (ácido fólico:TCEP) e deixou-se a mistura a reagir durante 1 hora.

Após a redução para ácido fólico-SH com o TCEP, este foi adicionado à suspensão lipossomal preparada na proporção (molar) de 1:10 e 1:40 (ácido fólico:grupos maleimida). As proporções foram escolhidas de modo a que o ácido fólico fique em excesso de 1:10 ou de 1:40 em relação aos grupos maleimida fazendo com que haja grupos SH do ácido fólico suficientes para haver ligação (devido ao baixo rendimento de activação). Este composto foi adicionado nas mesmas quantidades aos lipossomas sem grupos maleimida de modo a testar interacções não específicas. A reacção ocorreu num tubo de *Eppendorf* de 2,0 mL durante a noite com agitação num agitador orbital. Seguidamente, os lipossomas foram purificados por cromatografia de exclusão molecular (coluna *Econo-Pack[®] 10 DG*) e caracterizados quanto ao seu tamanho, carga, concentração lipídica e quantidade de ácido fólico ligado.

2.2. Preparação de lipossomas direccionados com antagonista G

O péptido antagonista G (H-Arg-DTrp-N^{me}-Phe-DTrp-Leu-Met-NH₂) foi ligado covalentemente aos lipossomas por dois métodos diferentes: ligação directa aos lipossomas formados e pelo método de pós-inserção.

2.2.1. Activação do antagonista G com um grupo sulfidrilo

Independentemente do método de ligação, o péptido foi previamente activado pelo processo de tiolação, com uma molécula de 2-iminotiolano (reagente de Traut). A solução *stock* do péptido foi preparada em água a uma concentração de 5 mM. Um volume apropriado foi retirado e activado com 2-iminotiolano (20 mM) em tampão HEPES a pH 8,0. A razão molar de péptido:reagente de Traut foi de 1:4. A reacção ocorreu durante 1 hora à temperatura ambiente. Após este tempo de incubação, foi adicionado um grupo sulfidrilo ao N-terminal do péptido (ver reacção na secção de resultados e discussão). A activação do péptido foi efectuada num recipiente de vidro cujo interior foi revestido por um derivado de silicone, organopolisiloxano (Sigmacote®, Sigma), uma vez que esta molécula interage com o vidro quando está na forma livre.

2.2.2. Ligação do antagonista G aos lipossomas pelo método directo

2.2.2.1. Preparação de lipossomas

Os lipossomas foram preparados segundo o método descrito anteriormente (no caso da ligação do ácido fólico). A formulação lipídica usada foi EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida na razão molar de 68,25:30,5: 0,55:0,7.

2.2.2.2. Ligação do péptido aos lipossomas

O péptido activado foi adicionado aos lipossomas contendo maleimida na proporção de 1,4:1 (péptido:grupo maleimida). A reacção de ligação ocorreu durante a noite (12 a 18 h) à temperatura ambiente em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0. Os lipossomas foram purificados do péptido não ligado por ultracentrifugação a 300 000 x g, a 15 °C, durante 2 h, usando a ultracentrifuga L8-60M Beckman Instruments, EUA, com um rotor do tipo 70 Ti. Após a purificação, os lipossomas foram caracterizados quanto ao seu tamanho, carga, concentração lipídica e quantidade de péptido ligado.

2.2.3. Ligação do antagonista G aos lipossomas pelo método de pós inserção.

2.2.3.1. Preparação de lipossomas

Os lipossomas foram preparados segundo o método descrito anteriormente, com a excepção de não conter DSPE-PEG-maleimida. A formulação lipídica usada foi EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀, na razão molar de 68,25:30,5:0,55.

2.2.3.2. Preparação de micelas de DSPE-PEG-maleimida e ligação do péptido

Para o método de pós inserção foi necessário preparar micelas de DSPE-PEG-maleimida. Para tal, a quantidade correspondente a 0,7 % (mol) deste lípido foi dissolvida em clorofórmio num tubo de ensaio seguido da sua evaporação sob fluxo contínuo de azoto. O filme resultante foi hidratado com tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0 para uma concentração de lípido 0,5 mM (concentração micelar crítica para este lípido). À suspensão de micelas foi adicionado o péptido activado na proporção de 1,4:1 (péptido:maleimida) e deixou-se a reacção ocorrer durante a noite à temperatura ambiente.

2.2.3.3. Inserção de DSPE-PEG-antagonista G em lipossomas

Após a ligação do péptido às micelas, estas foram adicionadas aos lipossomas preparados anteriormente. A inserção ocorreu durante 1 hora à temperatura ambiente. Após 1 hora os lipossomas foram purificados por ultracentrifugação, a 300 000 x g, a 15 °C, durante 2 h e caracterizados quanto ao tamanho, carga, concentração lipídica e quantidade de péptido ligado.

2.3. Caracterização dos lipossomas

2.3.1. Doseamento de lípido

A concentração lipídica das suspensões lipossomais preparadas foi determinada pelo método de doseamento de fosfatos, conhecido como o método de Rouser⁸². Em resumo, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio e o tampão foi completamente evaporado a 170 °C. De seguida, adicionou-se ácido perclórico 70 % aos tubos e a hidrólise ácida ocorreu a 180 °C durante cerca de 45 min. Para não haver perdas de volume, os vapores de ácido foram contidos nos tubos com a ajuda de

berlindes de vidro. Seguidamente adicionaram-se por esta ordem: 1 mL água destilada, 0,40 mL de molibdato de amónia 1,25 % (m/v) e 0,40 mL de ácido ascórbico 5 % (m/v). Após a agitação vigorosa, os tubos foram incubados em banho a 100 °C durante 5 min. Após o arrefecimento, foi lida a absorvência das soluções a 797 nm no espectrofotómetro *Spectrophotometer UV-mini 1240, Shimadzu*). Para a curva de calibração, usou-se uma solução de padrão de fosfato de sódio 0,5 mM a partir da qual fizeram-se diluições na gama de 9 – 40 µM.

2.3.2. Doseamento do ácido fólico

Para o doseamento de ácido fólico após a ligação aos lipossomas, usou-se o método de doseamento optimizado anteriormente: preparou-se uma curva de calibração de ácido fólico na presença de lipossomas e triton X-100. Segundo o mesmo procedimento, os lipossomas após a ligação do ácido fólico foram lisados pelo mesmo detergente de modo a conter a mesma concentração lipídica e de triton X-100 que na curva de calibração. As medidas de intensidade de fluorescência foram efectuadas pelo aparelho *Hitachi F-3000 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi High-Technologies Corporation, Tóquio, Japão)*, com o comprimento de onda de excitação de 360 nm e o comprimento de onda de emissão fixo em 445 nm. As respectivas larguras das fendas foram de 5nm e de 20nm, de modo a maximizar o sinal de emissão medido pelo aparelho.

2.3.3. Doseamento do antagonista G

Após a preparação dos lipossomas direccionados com o antagonista G pelos dois métodos descritos, o doseamento do péptido foi efectuado por espectroscopia de fluorescência (devido aos dois resíduos de triptofano na sua sequência), com medida da intensidade de emissão a 330 nm, com excitação a 288 nm (usando *Hitachi F-3000 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi High-Technologies Corporation, Tóquio, Japão)*, com larguras de bandas de excitação e de emissão de 5 nm). Os lipossomas foram lisados com metanol, uma vez que este solvente não apresenta elevada interferência na fluorescência do péptido.

O doseamento do antagonista G foi feito recorrendo a uma curva de calibração preparada a partir da solução *stock* deste péptido. Foram preparadas diluições de 0 a 2 µg/mL (2,1 µM) aos quais foram adicionados lipossomas com a mesma formulação, usada no método da ligação directa os quais foram posteriormente lisados com metanol. Assim, a curva de calibração continha o mesmo teor de lípidos e metanol que as amostras após a ligação do péptido.

2.3.4. Determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas

A determinação do tamanho médio das partículas preparadas foi feita por espectrometria de correlação fotónica (DLS, explicado na introdução), usando o aparelho *Zetasizer, Nano S (Malvern Instruments, Reino Unido)*. Os resultados apresentados são médias de 3 medições, cada uma delas com 13 leituras individuais.

O índice de polidispersão (PDI) é apresentado como medida da homogeneidade da população de partículas. Este pode tomar valores entre 0 e 1, sendo 0 uma população monodispersa e 1 uma população totalmente dispersa. Valores inferiores a 0,05 são indicadores de populações consideradas quase homogéneas em torno do tamanho médio. Em geral, valores de PDI abaixo de 0,2 são considerados como satisfatórios na preparação de lipossomas.

As amostras foram diluídas 10 vezes com o tampão de preparação previamente às medições de tamanho.

2.3.5. Determinação do potencial zeta

O potencial zeta (ζ) das partículas preparadas foi determinado com o uso do aparelho *Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido)*. O princípio da técnica e do tratamento de sinal por este aparelho são explicados com algum detalhe na introdução.

Uma vez que os lípidos maioritários nas formulações lipossomais usados eram neutros, os resultados da carga superficial servem para demonstrar que a neutralidade é mantida após os processos de ligação de diferentes ligandos.

2.4. Determinação da expressão do receptor de folato FR α em células

HeLa e MCF7 por RT-PCR

2.4.1. Desenho de *primers* de FR α

Para o RT-PCR do receptor de folato foram desenhados dois *primers* (*foreward* e *reverse*) a partir da sequência de mRNA do respectivo gene. A sequência de interesse foi encontrada no NCBI Gene Bank, a partir do gene de FOLR1 (gene id: 2348). Como produtos de transcrição e processamento do gene, estão apresentadas 4 variantes de mRNA na base dados (Gene Bank IDs: 262331571, 262331568, 262331569 e 262331573). As sequências encontradas foram alinhadas de modo a encontrar uma região homóloga comum a todas. A ferramenta usada no alinhamento múltiplo foi *Clustal Omega* (EMBL-EBI). Após o alinhamento, obteve-se uma região homóloga a todas as variantes de mRNA (Figura 11), a qual foi usada para desenhar os primers para este receptor, com a ajuda do programa *Primer 3* (Whitehead Institute, Cambridge, MA, USA).^{83,84}

```

1  GGACAGACATGGCTCAGCGGATGACAACACAGCTGCTGCTCCTTCTAGTGTGGGTGGCTG
61  TAGTAGGGGAGGCTCAGACAAGGATTGCATGGGCCAGGACTGAGCTTCTCAATGTCTGCA
121 TGAACGCCAAGCACCACAAGGAAAAGCCAGGCCCCGAGGACAAGTTGCATGAGCAAGTGTG
181 GACCCTGGAGGAAGAATGCCTGCTGTTCTACCAACACCAGCCAGGAAGCCCATAAGGATG
241 TTTCTTACCTATATAGATTCAACTGGAACCACTGTGGAGAGATGGCACCTGCCTGCAAAC
301 GGCATTTTCATCCAGGACACCTGCCTCTACGAGTGCTCCCCCAACTTGGGGCCCTGGATCC
361 AGCAGGTGGATCAGAGCTGGCGCAAAGAGCGGGTACTGAACGTGCCCCTGTGCAAAGAGG
421 ACTGTGAGCAATGGTGGGAAGATTGTGCGCACCTCCTACACCTGCAAGAGCAACTGGCACA
481 AGGGCTGGAACTGGACTTCAGGGTTTAAACAAGTGCGCAGTGGGAGCTGCCTGCCAACCTT
541 TCCATTTCTACTTCCCCACACCCACTGTTCTGTGCAATGAAATCTGGACTCACTCCTACA
601 AGGTCAGCAACTACAGCCGAGGGAGTGGCCGCTGCATCCAGATGTGGTTCGACCCAGCCC
661 AGGGCAACCCCAATGAGGAGGTGGCGAGGTTCTATGCTGCAGCCATGAGTGGGGCTGGGC
721 CCTGGGCAGCCTGGCCTTTCTGCTTAGCCCTGGCCCTAATGCTGCTGTGGTCTGCTCAGCT
781 GACCTCCTTTTACCTTCTGATACCTGGAAATCCCTGCCCTGTTTCAGCCCCACAGCTCCCA
841 ACTATTTGGTTCTGCTCCATGGTCGGGCCTCTGACAGCCACTTTGAATAAACAGACAC
901 CGCACATGTGTCTTGAGAATTATTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 11: Sequência de mRNA homóloga às quatro variantes de mRNA do receptor de folato FR α , obtida por alinhamento múltiplo. A vermelho estão representadas as regiões usadas para desenhar os primers e sombreada a cinzento está a região de amplificação

As sequências obtidas como *primers* a partir da sequência introduzida no programa foram: *forward primer*: 5'-GAGGACAAGTTGCATGAGCA-3' (com temperatura de fusão, T_m = 60 °C e %GC = 50) e *reverse primer*: 3'-GGTGTAGGAGGTGCGACAAT-5' (T_m = 60 °C e %GC = 55). O tamanho da região a amplificar (região entre os *primers*) é de 306 pares

de bases. Os *primers* desenhados foram adquiridos a Sigma-Aldrich Co. St. Louis Mo (EUA).

2.4.2. Extracção de RNA e electroforese em gel de agarose

A extracção de RNA total das células foi feita com a ajuda do kit de extracção de RNA, segundo o protocolo incluído (Invitrogen Carlsbad, USA). Resumidamente, as células HeLa e MCF7 foram plaqueadas em placas de 6 poços a uma densidade de 5×10^5 células/poço e incubadas na estufa humidificada a 37°C com 5 % de CO_2 durante a noite, de modo a aderirem ao fundo dos poços. Usou-se o reagente Trizol® para lisar e suspender as células, e com a ajuda de cloróformio, procedeu-se à extracção de fase do RNA. A mistura foi centrifugada a $12\,000 \times g$, a 4°C durante 15 min, extraíndo-se a fase aquosa (contém o RNA). Este ácido nucleico foi precipitado com isopropanol e após uma nova centrifugação a $12\,000 \times g$, a 4°C durante 8 min, o precipitado foi lavado com etanol a 75 % (v/v) (ressuspendido e centrifugado a $7500 \times g$ durante 5 min a 4°C). Após a evaporação completa do etanol, o RNA foi dissolvido num volume mínimo de água destilada (até 20 μL). A solução de RNA foi guardada a -20°C para usos futuros.

Todo o procedimento de extracção de RNA foi efectuado em gelo (a 4°C), usando material e reagentes livres de RNAses (material autoclavado e manuseado com luvas e água destilada de qualidade Milli-Q).

Após a extracção do RNA, preparou-se gel de agarose a 1 % (m/V), contendo Green Safe a 0,001 % (V/V) em tampão de electrofores de DNA, Tris-acetato-EDTA (TAE), no qual se aplicaram cerca de 500 ng de RNA diluído em tampão de aplicação, contendo glicerol e o corante *Orange G* (de modo a possibilitar a visualização da migração). Adicionalmente, aplicaram-se 500 ng da mistura de padrões de DNA (*GeneRuler DNA Ladder Mix*). Após a electroforese a 70 V (equipamento de electroforese: Bio-Rad Power PAC 300, USA) o gel foi fotografado sob uma lâmpada de raios UV.

2.4.3. Síntese de DNA complementar a partir do RNA extraído

O RNA extraído foi usado na síntese de cDNA, a partir do qual foi feito PCR. O procedimento baseou-se no protocolo do kit *Revertaid H minus*. Em resumo, 500 ng de RNA foram misturados com primer aleatório (*Random Hexamer Primer*, incluído no kit), inibidor de RNase, mistura de dNTP e transcriptase reverso *Revertaid H minus M-MuLV*, em tampão de reacção 5X (Tris-HCL 250 mM, pH 8,3, KCl 250 mM, MgCl₂ 20 mM, DTT 50 mM). A mistura foi incubada 5 min a 25 °C, seguida da incubação a 42 °C durante 60 min, seguida da incubação a 70 °C durante 5 min para terminar a reacção de síntese de cDNA. Este procedimento foi efectuado com o uso de *PTC-100® Peltier Thermal Cycler MJ Research*.

2.4.4. Reacção em cadeia do polimerase (PCR)

Os *primers* desenhados foram usados para amplificar a região de 306 pares de bases do cDNA sintetizado. O procedimento foi baseado no protocolo do kit de *Taq Polimerase*. Preparou-se uma mistura de dNTPs, 500 ng de cDNA sintetizado, *primeris* de FR α e *Taq Polimerase* em tampão de PCR (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM). A mistura foi suplementada com MgCl₂, como cofactor do *Taq Polimerase*. Como controlo positivo de PCR, preparou-se uma mistura idêntica, com a excepção de conter *primers* para um enzima constitutivamente expresso em todas as células, o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). De seguida, as soluções preparadas foram incubadas a 94 °C durante 45 min, de modo a desnaturar o DNA, seguida da incubação a 57 °C durante 30 s, de modo a possibilitar a hibridação dos *primers* com as cadeias de cDNA, seguida da incubação a 72 °C durante 1 min e 30 s, de modo a promover a extensão das cadeias sintetizadas e, por último, a reacção foi terminada com uma incubação adicional a 72 °C durante 10 min. Este processo foi repetido por mais 29 ciclos no *PTC-100® Peltier Thermal Cycler MJ Research*.

Após o PCR, as amostras foram diluídas em tampão de aplicação, contendo glicerol e o corante *Orange G* e aplicadas em gel de agarose 1,5 % (m/V), Green Safe 0,001 % (v/v) em tampão TAE. Adicionalmente foi aplicada uma mistura de padrões de DNA, *GeneRuler DNA Ladder Mix* e o gel foi sujeito a 80 V (equipamento de electroforese: Bio-Rad Power PAC 300, USA) de diferença de potencial. Após a electroforese, o gel foi fotografado sob uma lâmpada de UV.

2.5. Ensaios de internalização celular de lipossomas por microscopia de fluorescência

Os lipossomas não direccionados e direccionados com ácido fólico e antagonista G (preparados por dois métodos diferentes) foram preparados contendo PE-Rodamina. A sua preparação foi idêntica aos lipossomas não marcados com esta sonda fluorescente, com a excepção de se acrescentar um passo de esterilização por filtração, com um filtro estéril de PTFE de 0,2 µm de poro.

As células HeLa e MCF7 foram plaqueadas em lamelas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^4 por poço em meio DMEM suplementado com FBS 10 %, penicilina-streptomicina 100 U/mL e 2 mM de L-glutamina e incubadas na estufa humidificada a 37 °C, com CO₂ 5 % durante 24 h de modo a aderirem às lamelas. De seguida, o meio foi retirado e as células lavadas com o tampão DPBS (adquirido a Thermo Scientific). O meio foi trocado por RPMI, contendo lipossomas a uma concentração lipídica de 500 µM e as células foram incubadas neste meio durante 1 ou 3 h na estufa. A troca do meio para RPMI durante a incubação com lipossomas direccionados com ácido fólico deveu-se ao facto de este meio possuir uma concentração mais baixa de ácido fólico, competindo menos na ligação dos lipossomas aos respectivos receptores. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído (PFA) 2 % (m/v). Após a lavagem com PBS, adicionou-se o corante de DNA de dupla cadeia, DAPI, de modo a corar os núcleos. Após a coloração e consequente lavagem com PBS, as lamelas foram montadas em meio de montagem Mowiol® sob lâminas de vidro. As imagens foram adquiridas com a câmara digital *Olympus CAMEDIA C-4040ZOOM*, ligada ao microscópio de fluorescência *Olympus BX40 TF* (objectiva UPlanFi, de 40x de ampliação, 0,75 de abertura), com lâmpada de fluorescência *Olympus U-RFL-T* (Japão). O tempo de exposição e abertura da lente da câmara foram controlados por *Cam2Com 4.1 – Digital Camera Control Software, Sabsic*, mantendo-se constantes ao longo de todas as experiências.

As células H69 foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço em meio RPMI-1640 suplementado da mesma forma que o meio DMEM contendo lipossomas não direccionados ou direccionados com antagonista G

MATERIAIS E MÉTODOS

(preparados por ligação directa, ou pelo método de pós inserção) a uma concentração lipídica de 500 μM e incubadas durante 1 ou 3 h na estufa. Após a incubação, as células foram centrifugadas 153 x g durante 15 min e ressuspendidas em PBS. A lavagem foi efectuada mais 2 vezes. De seguida, uma gota da suspensão celular foi aplicada entre uma lâmina e lamela e as imagens das células foram adquiridas, usando o método aplicado às células HeLa e MCF7.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Notas introdutórias

A escolha de um de um sistema lipossomal direccionado para receptores específicos em células tumorais tem de obedecer a vários critérios: elevada afinidade para o local tumoral, elevada estabilidade do sistema lipossomal de entrega direccionado, manutenção da afinidade/selectividade do ligando para o respectivo receptor mesmo depois de imobilizado à superfície do lipossoma, etc.

Neste trabalho, foram escolhidos dois sistemas lipossomais direccionados em que os ligandos foram o ácido fólico e o antagonista G (péptido). O ácido fólico, para além da sua selectividade para diversos tipos de tumores, é uma molécula fácil de obter e isolar (através da síntese química ou fontes alimentares), pelo que não apresenta custos elevados, dando flexibilidade aos processos de optimização que exijam experimentação frequente. O antagonista G é um péptido mimético de vários tipos de neuropéptidos com funções de factores de crescimento que se ligam aos receptores expressos em elevados níveis em células tumorais do cancro do pulmão (SCLC). Apesar de envolver maiores custos de obtenção e isolamento, a sua química de activação e ligação aos lipossomas envolve menos passos.

O presente estudo destina-se a elucidar os passos mais críticos na preparação deste tipo de sistemas, fornecendo resultados do método de preparação de lipossomas direccionados com ácido fólico e a sua internalização em células tumorais (HeLa e MCF7). Foi igualmente estudado processo de ligação do antagonista G por 2 métodos diferentes: ligação directa e pós inserção. Em ambos os casos, foi dada especial atenção à optimização da preparação do veículo de entrega de fármacos sem considerar a possível incorporação dos agentes citotóxicos, sendo este um objectivo para estudos futuros.

Nas secções que se seguem estão apresentados e discutidos os resultados principais do estudo efectuado, desde a activação da molécula de ácido fólico e antagonista G, a sua ligação aos lipossomas, até à internalização dos lipossomas preparados em células tumorais (estudo preliminar qualitativo).

A Figura 12 resume esquematicamente o trabalho de optimização e preparação de lipossomas direccionados com AF e antagonista G a usar em ensaios com células.

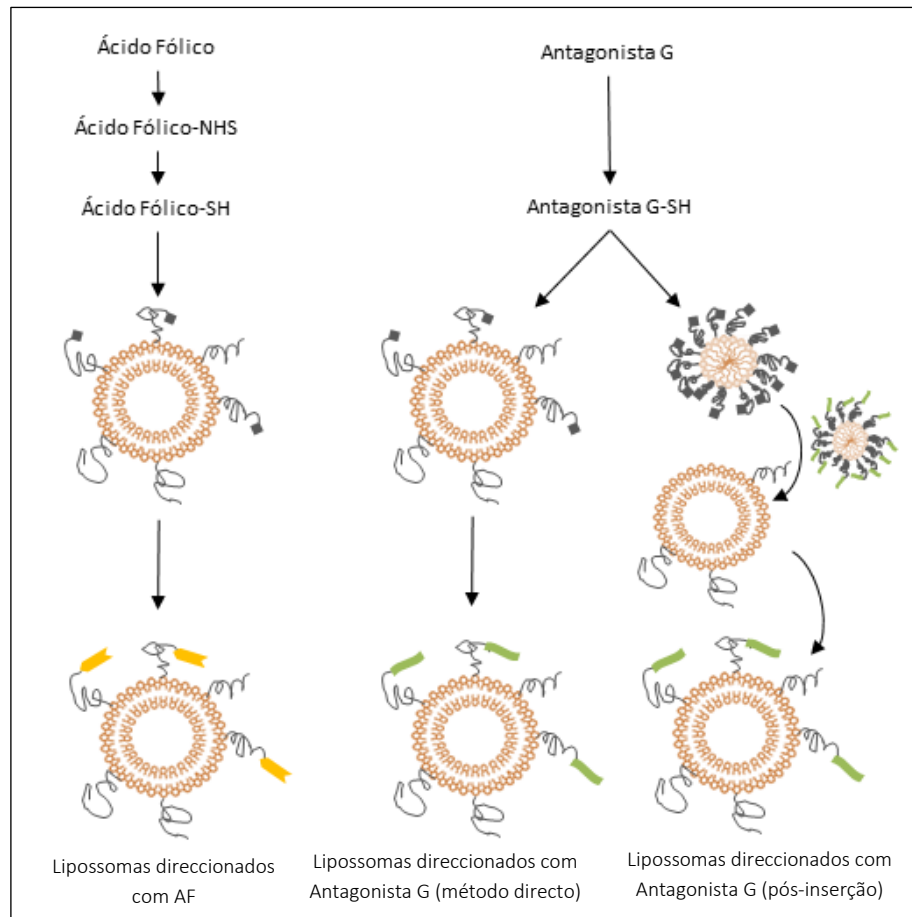


Figura 12: Diagrama de resumo dos processos de activação e ligação do ácido fólico (AF) e antagonista G aos lipossomas. Ácido fólico-NHS – ácido fólico esterificado com uma molécula de N-hidroxisuccinimida

2. Activação e ligação covalente de Ácido Fólico aos Lipossomas

Uma vez que o ácido fólico é uma molécula pouco reactiva (não tendo em conta as suas reacções envolvendo catálise enzimática), na escala de tempo útil dos ensaios laboratoriais, tem de ser activado quimicamente antes da sua ligação aos lipossomas.

O acoplamento efectuado neste trabalho foi dividido em duas etapas principais: (a) activação química do ácido fólico, de modo a conter um grupo funcional reactivo e (b) acoplamento do composto resultante à superfície dos lipossomas. A primeira etapa do procedimento foi baseada na abordagem descrita por Chan e colegas⁵⁶, onde o ácido fólico é esterificado com um grupo N-hidroxisuccinimida (NHS), seguido de uma substituição nucleofílica envolvendo uma molécula de 2-aminoetanotiol (cisteamina). Desta forma é adicionado um grupo sulfidrílo ao ácido fólico, que pode ser usado na ligação ao PEG funcionalizado com um grupo maleimida na extremidade.

Previamente à reacção de activação, as propriedades físico-químicas do ácido fólico foram exploradas, de modo a otimizar o doseamento e prever o seu comportamento em diferentes tipos de solvente.

2.1. Optimização do protocolo de doseamento do ácido fólico

O ácido fólico ($C_{19}H_{19}N_7O_6$, Massa molecular = 441,40 g/mol) é o composto de maior estado de oxidação, maior estabilidade e menor solubilidade em solventes aquosos, entre os membros da família de vitaminas B₉ (folatos). A sua solubilidade em água destilada a 25 °C é de 0,0016 mg/mL (4 µM) que aumenta com o aumento do pH. Este composto é praticamente insolúvel em soluções ácidas, embora existam estudos que apontem para um comportamento hiperbólico da solubilidade na gama de valores de pH ente 0 e 7, com um mínimo de solubilidade em soluções a pH 3,0.⁸⁵ A valores de pH elevados, este composto torna-se completamente ionizado ($pK_{a1} = 4,65$; $pK_{a2} = 6,75$; $pK_{a3} = 9,00$) e facilmente solúvel, pelo que as soluções *stock* (ácido fólico na ordem de 100 mM) são geralmente preparadas em NaOH 1 M. Para além de soluções ácidas, este composto é insolúvel em solventes orgânicos e em álcoois.

A sua estabilidade é reduzida em soluções ácidas, a temperaturas elevadas e sob radiação UV/Visível.⁵ A Figura 13 esquematiza a fotodegradação do ácido fólico. Devido à sua fotossensibilidade, todas as experiências têm de ser efectuadas evitando raios solares directos e o material de laboratório que contém soluções desta vitamina tem de ser coberto com papel de alumínio.

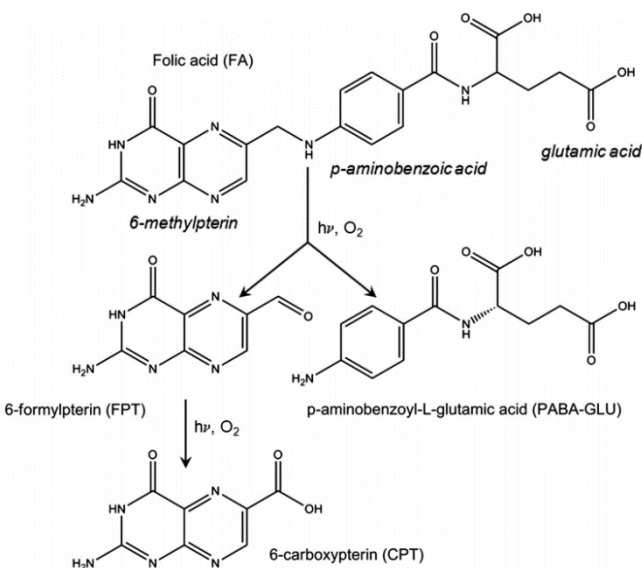


Figura 13: Representação esquemática da fotodegradação do ácido fólico (citado de ⁵)

Caso se pretenda armazenar soluções de ácido fólico por períodos de tempo relativamente prolongados, geralmente usa-se um composto redutor, como o ácido ascórbico a 1 % (m/v) ou o 2-mercaptoetanol para reduzir a pressão parcial de oxigénio em solução, evitando desta forma a oxidação deste folato.

2.1.1. Espectroscopia de absorção UV/Visível

O doseamento de ácido fólico é geralmente efectuado usando espectroscopia de absorção UV/Visível. A presença de anéis heterocíclicos com várias ligações duplas conjugadas resulta no aparecimento de 3 picos de absorção: a 256 nm, a 285 nm ($\epsilon_{285\text{nm}} = 27500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e a 363 nm ($\epsilon_{363\text{ nm}} = 6197 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Para testar a linearidade do método de doseamento por medição de absorvência a um dos comprimentos de onda de absorção acima mencionados, prepararam-se diferentes diluições de ácido fólico em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0 a partir da solução *stock* a 100 mM em NaOH 1 M. Foram feitas diluições para concentrações finais de 20, 40, 60, 80 e 100 μM e traçados os espectros de absorção de cada uma delas. Os valores obtidos e os respectivos espectros estão apresentados na Tabela 6 e Figura 14, respectivamente.

Tabela 6: Valores de absorvência a diferentes comprimentos de onda (c.d.o.) de diferentes concentrações de ácido fólico (AF) em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0

c.d.o. (nm)	AF 20 μM	AF 40 μM	AF 60 μM	AF 80 μM	AF 100 μM
260	0,295	0,816	1,146	1,317	1,418
280	0,496	0,826	1,169	1,327	1,428
300	0,362	0,707	1,023	1,236	1,400
320	0,149	0,278	0,419	0,556	0,682
340	0,122	0,223	0,341	0,454	0,572
360	0,112	0,301	0,456	0,598	0,732
380	0,068	0,256	0,388	0,511	0,631
400	0,017	0,082	0,127	0,169	0,214
420	0,004	0,008	0,014	0,019	0,026
440	0,007	0,007	0,007	0,009	0,011
460	0,007	0,007	0,006	0,006	0,009
480	0,01	0,010	0,008	0,010	0,011
500	0,015	0,016	0,014	0,015	0,016

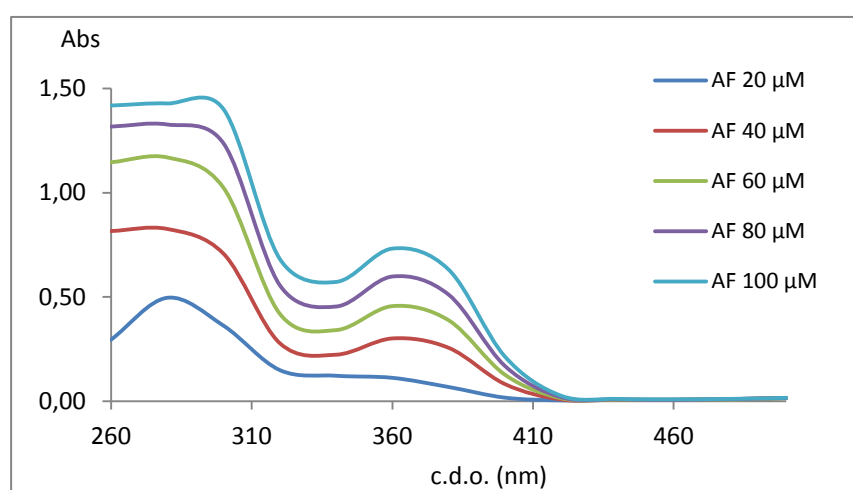


Figura 14: Espectros de absorção de diferentes concentrações de ácido fólico, em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0

Como se pode observar na Figura 14, foram obtidos dois picos de absorção na gama de comprimentos de onda utilizados. O pico de absorção perto de 280 nm é bastante alargado, sugerindo a presença de vários máximos não resolvidos por esta técnica. As medições a comprimentos de onda na região do ultravioleta são bastante dificultadas pela presença de inúmeros interferentes que absorvem nesta região de radiação, bem como devido a artefactos experimentais inerentes à medição. No caso do presente trabalho, como se pretende dosear o ácido fólico após a sua ligação aos lipossomas, a utilização do pico a 280 nm implicaria o isolamento deste composto da suspensão lipossomal, pois os lípidos têm uma absorvência bastante elevada a este comprimento de onda.

Os valores de absorvência a 280 e 360 nm foram representados em função da concentração de ácido fólico, de modo a estudar a linearidade do sinal nesta gama de concentrações. Os resultados obtidos estão representados na Figura 15.

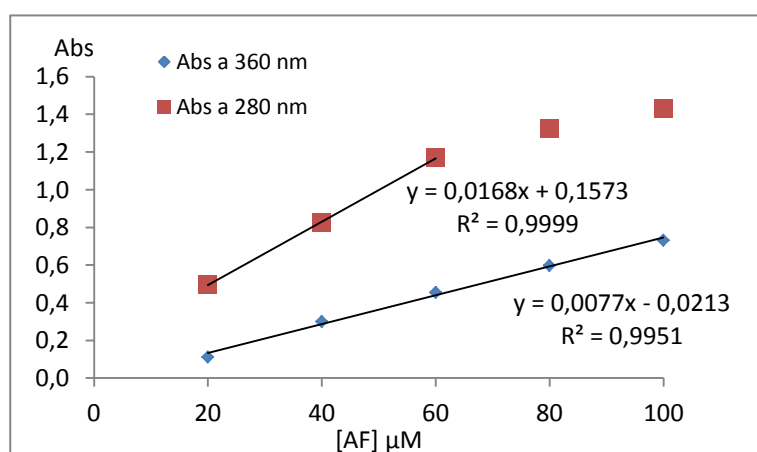


Figura 15: Representação gráfica de valores de absorvência a 280 e 360 nm de diferentes concentrações de ácido fólico em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0

A dependência do sinal a 280 nm da concentração de ácido fólico não segue uma tendência linear nesta gama de concentrações (apenas se observa uma tendência linear para concentrações entre 20 e 60 μM). Como se pode observar na Figura 15, os valores de absorvência a este comprimento de onda são bastante elevados, ultrapassando a resposta linear prevista pela lei de Lambert-Beer (valores de absorvência inferiores a 1,000). Medições a 280 nm seriam úteis para amostras de ácido fólico puras (ou com o mínimo de interferentes possível) e para concentrações inferiores a 60 μM , quando se pretende ter uma sensibilidade elevada.

Por outro lado, obteve-se uma relação linear entre absorvência a 360 nm e as concentrações de ácido fólico escolhidas e, tal como encontrado na literatura, o respectivo coeficiente de absorção molar é significativamente mais baixo em relação ao coeficiente a 280 nm. O valor obtido para este parâmetro foi aproximadamente de $7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, situando-se na mesma ordem de grandeza do valor encontrado na literatura ($6197 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). As diferenças podem dever-se a condições experimentais como o tampão usado, pH, temperatura, concentração salina, etc.

A gama de concentrações escolhida para este ensaio é justificada pela concentração máxima, teoricamente admissível, de ácido fólico presente em lipossomas após o acoplamento (concentração lipídica de 20 mM, com 0,7 % mol de DSPE-PEG-maleimida, o que resulta em 140 μM de grupos maleimida presentes na suspensão lipossomal; ver secção de materiais e métodos). Os factores experimentais que limitam (bastante) este valor teórico de ácido fólico a dosear serão discutidos mais adiante.

Apesar de as medidas de absorvência a 360 nm, estatisticamente se ajustarem melhor a uma regressão linear, a sensibilidade do sinal deixa de ser suficiente para concentrações de ácido fólico inferiores a 10 μM . O valor do máximo teórico de 140 μM de ácido fólico é calculado para a suspensão original de lipossomas, ou seja, após a hidratação do filme e extrusão, quando a concentração lipídica está no seu valor máximo (20 mM). Esta quantidade de lípido é demasiado elevada para ser desprezada no doseamento de ácido fólico, pelo que será necessário fazer uma diluição da suspensão. Para minimizar a sua interferência na medição de absorvência a este comprimento de onda, a suspensão lipossomal tem de ser diluída no mínimo de 1:10 (v/v). Assim, esta abordagem diminui o patamar máximo teórico do ácido fólico a dosear para 14 μM . Com isto, os dois picos de absorvência do ácido fólico observados são excluídos da estratégia para o doseamento deste composto, sendo necessário recorrer a uma técnica menos sensível a interferentes e mais sensível ao composto a dosear.

2.1.2. Espectroscopia de fluorescência

Moléculas com vários anéis aromáticos, normalmente são consideradas como bons cromóforos, possibilitando o uso de técnicas de espectroscopia de absorvência para a sua detecção e doseamento. Para além disso, estas configurações electrónicas também podem possibilitar o seu uso como fluoróforos. O domínio de pterina e do ácido *para*-aminobenzóico tornam o ácido fólico também num composto capaz de emitir fluorescência. Esta vitamina não é, no entanto, considerada como um bom fluoróforo, apesar do seu rendimento quântico de fluorescência ser suficiente para ser explorado como alternativa ao seu doseamento por espectroscopia de absorvência. Juzeniene e colegas recorreram a técnicas de espectroscopia de fluorescência para estudar a fotodegradação do ácido fólico em soluções aquosas, fazendo medições de soluções desta vitamina na ordem 1 μM .⁵

No presente estudo, a linearidade de resposta de fluorescência em função da concentração de ácido fólico na gama de concentrações de 1 a 10 μM foi testada na ausência e na presença de lípidos e detergente Triton X-100. A dispersão de luz causada pela presença de lipossomas intactos em suspensão pode causar interferências graves na medição de intensidade de fluorescência. Por esta razão, as medições foram efectuadas na presença de lipossomas intactos e após a sua destruição com Triton X-100.

Foram preparadas diluições de ácido fólico (1-10 μM) em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0, na presença ou ausência de lipossomas e/ou detergente Triton X-100 [concentração lipídica final 2 mM, quantidade de Triton X-100 final 1,2 % (v/v)]. Foram traçados espectros de excitação e emissão das amostras preparadas usando o Espectrofluorímetro *Spex Fluorolog-3 v2.2, HORIBA Jobin Yvon (Kyoto, Japão)*. De seguida, apresentam-se os resultados obtidos das amostras de ácido fólico em tampão citrato (Figura 16, Figura 17, e Figura 18)

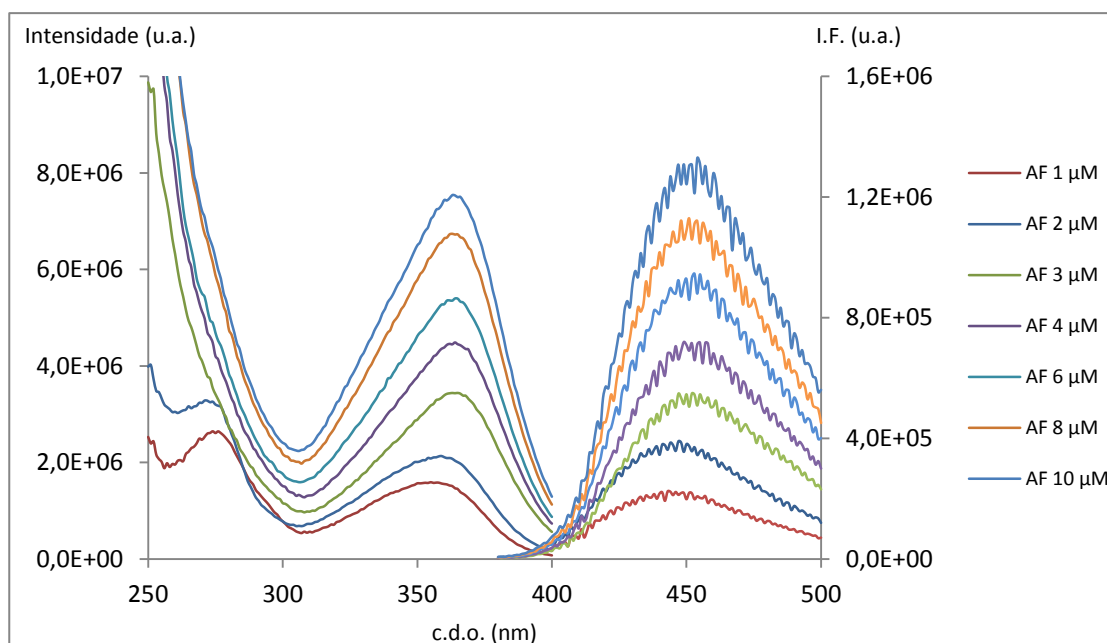


Figura 16: Espectros de excitação e emissão de diferentes concentrações de ácido fólico (AF) (após a subtração do branco: tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0). Espectro de excitação traçado de 250 a 400 nm c.d.o. emissão = 445 nm e espectro de emissão traçado de 380 a 500 nm, com c.d.o. de excitação de 360 nm.

Como se pode observar na Figura 16, existe uma elevada quantidade de ruído nos espectros de emissão do composto (deve-se aos artefactos experimentais do aparelho). Para minimizar este factor, de modo a ser possível tratar os resultados, aplicou-se o método de Stavisky-Golay de minimização de ruído.⁸⁶ A Figura 17 apresenta os mesmos espectros da Figura 16, tratados por este método de minimização de ruído.

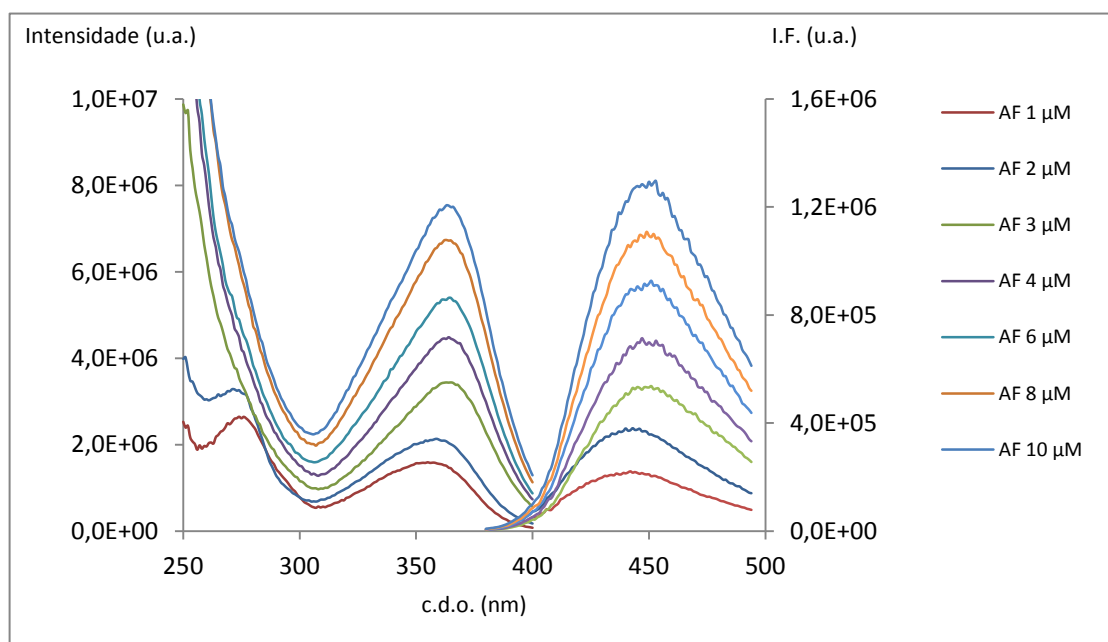


Figura 17: Espectros de excitação e emissão de diferentes concentrações de ácido fólico (AF) (após a subtração do branco: tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0 e após o tratamento com o método de eliminação de ruído de Stavisky-Golay). Espectro de excitação traçado de 250 a 400 nm, c.d.o. emissão = 445 nm e espectro de emissão traçado de 380 a 500 nm, com c.d.o. de excitação de 360 nm

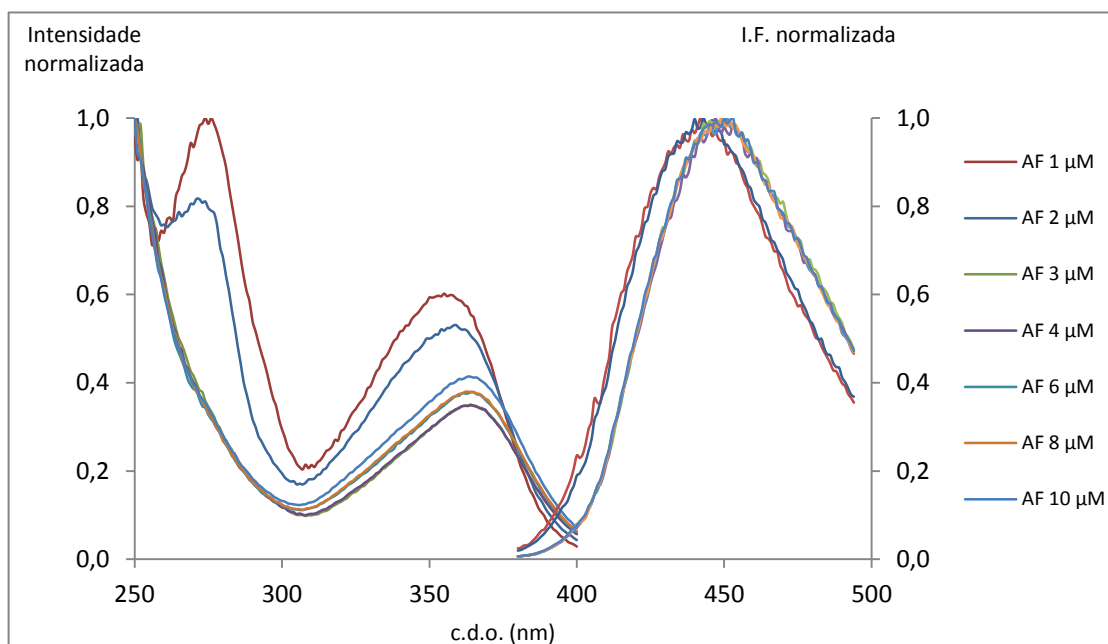


Figura 18: Espectros de excitação e emissão normalizados em relação ao valor de intensidade máximo medido em diferentes concentrações de ácido fólico (AF)

Tal como encontrado na literatura^{5,87}, foi possível observar dois picos nos espectros de excitação deste composto (a 270 nm e a 360 nm) e um pico no espectro de emissão (a 445 nm) (Figura 17 e Figura 18 para concentrações de AF de 1 e 2 μM). No entanto, apenas no caso das amostras de menor concentração (1 e 2 μM) foi possível observar dois picos de excitação: um a 274 nm e outro a 355 nm. Para concentrações superiores, deixa de ser possível identificar dois picos, havendo um desvio do segundo pico para 364 nm (Figura 18).

De seguida, prepararam-se lipossomas pelo método de hidratação de filme lipídico seguido de dimensionamento por extrusão (em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM a pH 6,0 numa concentração lipídica final de 20 mM). A formulação lipossomal usada foi uma mistura de EPC:Coolesterol:DSPE-PEG₂₀₀₀, com razões molares de 68,25:30,5:1,25, respectivamente. Após a extrusão sequencial por filtros de 600, 400, 200 e 100 nm os lipossomas foram adicionados às diluições de ácido fólico preparadas para uma concentração de lípido final de 2 mM e traçados os respectivos espectros de excitação e de emissão (Figura 21). Adicionou-se detergente Triton X-100, na concentração final 1,2 % (v/v) para destruir os lipossomas (Figura 20 e Figura 21).

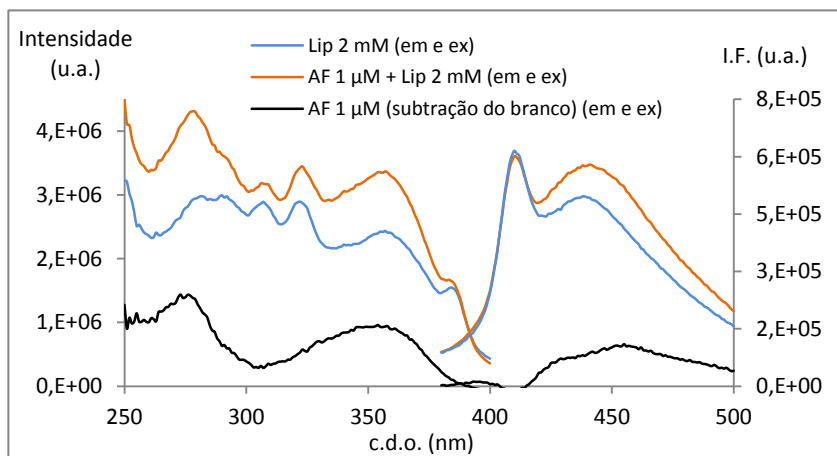


Figura 19: Espectros de excitação (ex) e emissão (em) de ácido fólico (AF) 1 μ M em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0, na presença de lipossomas 2 mM. Espectro de excitação traçado de 250 a 400 nm, c.d.o. emissão = 445 nm e espectro de emissão traçado de 380 a 500 nm, com c.d.o. de excitação de 360 nm

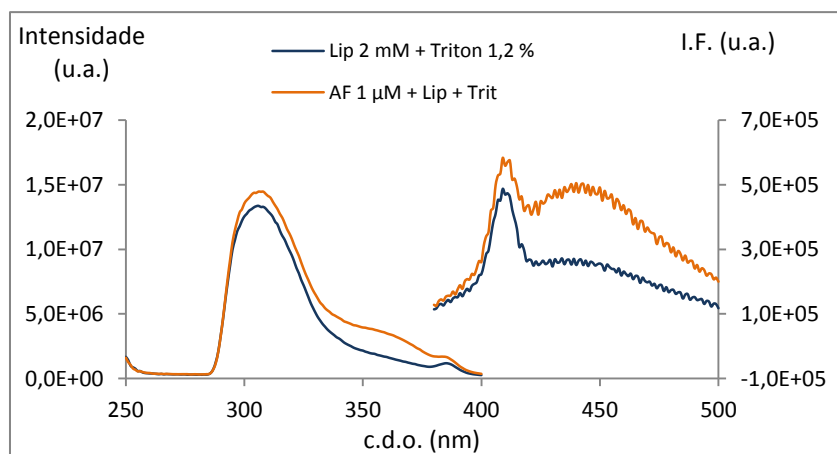


Figura 20: Espectros de excitação e de emissão de ácido fólico (AF) 1 μ M em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0 na presença de lipossomas 2 mM e Triton X-100 1,2 % (v/v)

As interferências causadas por lipossomas intactos na fluorescência do ácido fólico são demasiado elevadas, como se pode observar na Figura 19. Os espectros de excitação e de emissão obtidos apenas com amostras de lipossomas 2 mM apresentam intensidades bastante elevadas. Quando se adiciona 1 μ M de ácido fólico, observa-se um aumento de sinal relativamente baixo (tanto ao comprimento de onda de excitação usado, 360 nm, como ao comprimento de onda de emissão, 445 nm). Uma vez que os lipossomas se encontram na forma intacta, os efeitos de dispersão da luz causados por estes são demasiado elevados para serem desprezados no sinal de fluorescência do ácido fólico. Seria possível usar esta abordagem para sondas com maiores intensidades de fluorescência, onde fosse possível desprezar este efeito de dispersão de luz. Neste trabalho, os lipossomas têm de ser destruídos.

O espectro de excitação do Triton X-100 e lipossomas destruídos apresenta um pico bastante intenso na região de 310 nm, como se pode observar na Figura 20. Apesar disso, as interferências deste composto nas regiões de comprimentos de onda de excitação e de emissão usados, são inferiores em relação aos lipossomas intactos. Quando se adicionou 1 μM de ácido fólico à solução, observou-se um aumento da intensidade de fluorescência a 445 nm cerca de 5 vezes superior ao aumento observado no caso de lipossomas intactos.

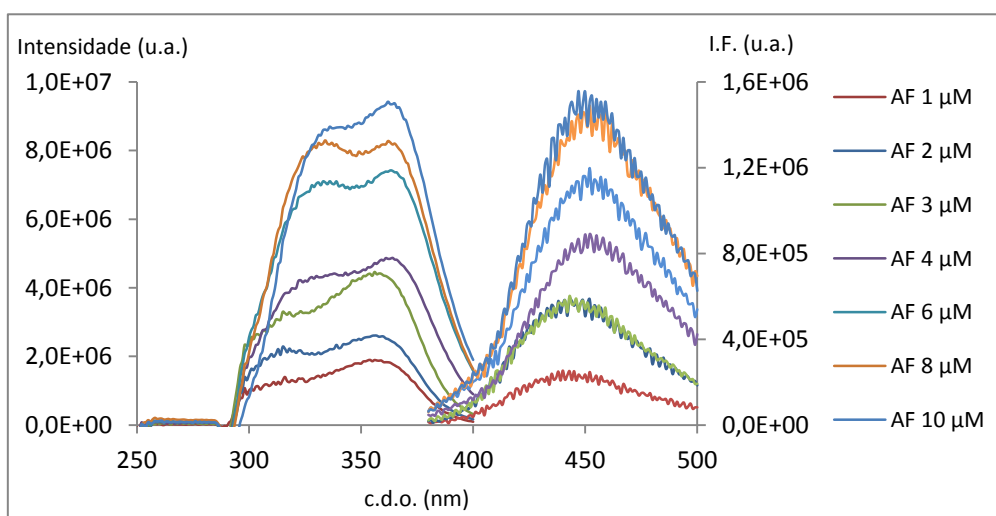


Figura 21: Espectros de excitação e emissão de diferentes concentrações de ácido fólico (AF) em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0, na presença de lipossomas 2 mM e Triton X-100 1,2 % (v/v). Espectro de excitação traçado de 250 a 400 nm, c.d.o. emissão = 445 nm e espectro de emissão traçado de 380 a 500 nm, com c.d.o. de excitação de 360 nm

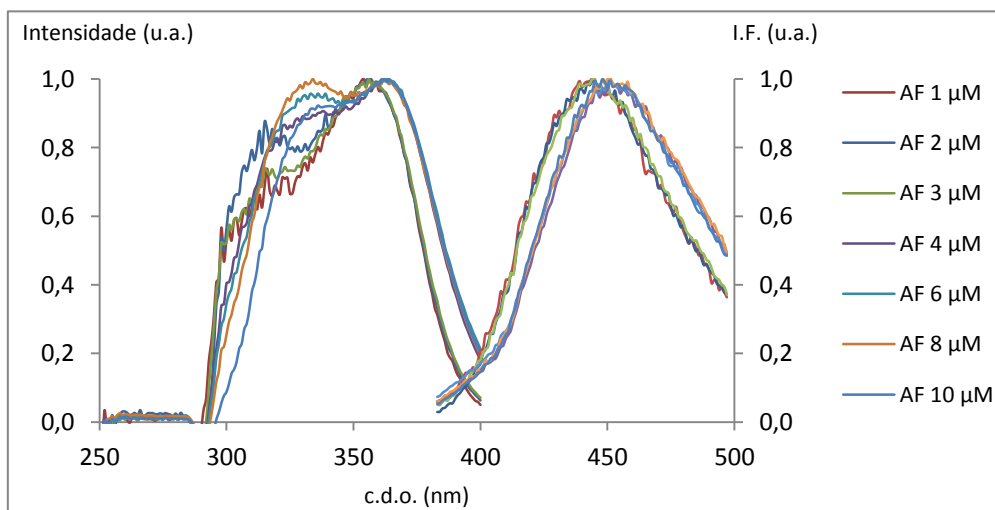


Figura 22: Espectros de excitação e emissão normalizados de diferentes concentrações de ácido fólico (AF) na presença de lipossomas 2 mM e Triton X-100 1,2 % (v/v)

Tendo em conta os resultados obtidos pela análise dos espectros, o doseamento de ácido fólico na presença de lipossomas e Triton X-100 foi efectuado com o c.d.o. de excitação a 360 nm e c.d.o. de emissão a 445 nm.

As medidas quantitativas de intensidade de fluorescência foram efectuadas usando o espectrofluorímetro *Hitachi F-3000 Fluorescence Spectrophotometer*, sendo possível obter uma boa resposta linear, como se pode observar na Figura 23. As curvas de calibração preparadas continham diferentes diluições de AF livre em tampão e na presença de lípido e detergente Triton X-100, de acordo com o procedimento optimizado. A medição de fluorescência foi feita a 445 nm, com o comprimento de onda de excitação de 360 nm. As larguras das fendas escolhidas para estas medições foram de 5 nm para a fenda de excitação e 20 nm para a fenda de emissão, de modo a obter melhor sinal no aparelho usado.

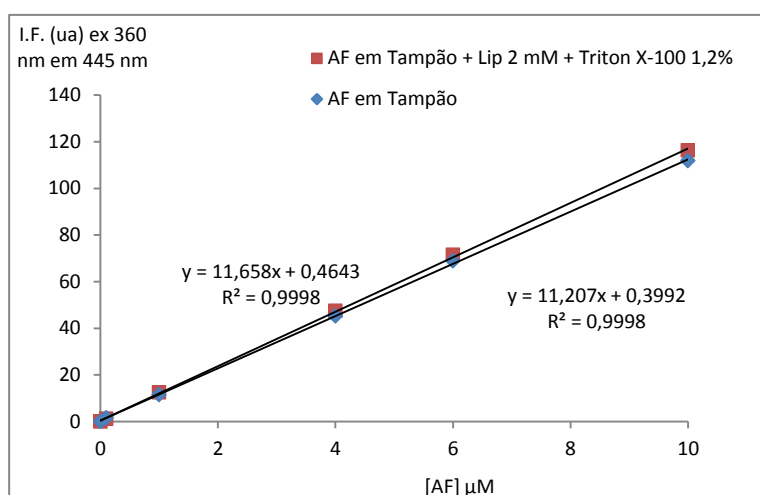


Figura 23: Representação gráfica das intensidades de fluorescência a 445 nm (c.d.o. excitação 360 nm) das diferentes concentrações de ácido fólico (AF) livre e na presença de lipossomas 2 mM e Triton X-100 1,2 % (v/v) após a subtracção do branco (lipossomas 2 mM com Triton X-100 1,2 % (v/v) em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0)

Como se pode observar na Figura 23, os valores de intensidade de fluorescência de diferentes concentrações de AF na presença dos interferentes testados (após a subtracção do respectivo branco, como é indicado na figura) aproximaram-se bastante aos valores das deste composto livre em tampão. Isto indica que as interferências podem ser ignoradas nestas condições de doseamento.

Outra informação a retirar da análise dos espectros obtidos anteriormente são pequenos desvios observáveis para maiores concentrações de AF, representados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de comprimentos de onda máximos (em nm) de excitação e de emissão de fluorescência de diferentes soluções de ácido fólico (AF) (dados obtidos a partir dos espectros representados nas figuras 18, 19 e 22)

AF (μ M)	AF livre		AF + Lipossomas + TritonX-100		AF + Lipossomas	
	c.d.o. max excitação	c.d.o. max emissão	c.d.o. max excitação	c.d.o. max emissão	c.d.o. max excitação	c.d.o. max emissão
1	355	445	354	444	354	455
2	354	446	356	445		
3	365	454	356	445		
4	364	450	364	451		
6	364	454	363	450		
8	363	452	362	450		
10	363	456	362	448		

É possível observar que quando a concentração de ácido fólico aumenta, há desvios na ordem de 10 nm para o vermelho nos dois tipos de espectros. Este fenómeno pode ser explicado pelos artefactos experimentais, nomeadamente pelo efeito do filtro interno, exercido pela própria espécie fluorescente em solução.

No caso de ácido fólico na presença de lipossomas intactos, o máximo de emissão ocorreu aos 455 nm, ou seja, 10 nm desviado para o vermelho, em relação ao ácido fólico livre e na presença de lipossomas destruídos pelo detergente. Esta observação poderá ser explicada pela interacção do ácido fólico com a bicamada lipídica dos lipossomas, levando à emissão de fluorescência deste composto de níveis electrónicos menos energéticos. No entanto, para um melhor entendimento deste fenómeno, é necessário recorrer a outros ensaios de fluorescência, como anisotropia ou decaimento de fluorescência, o que não é objecto do presente estudo.

2.2. Estudo das propriedades físico-químicas do dimetilsulfóxido

A activação do ácido fólico foi feita em dimetilsulfóxido (DMSO), solvente muito usado na síntese de lípidos funcionalizados com este composto.^{46,47,88} DMSO apresenta inúmeras vantagens no uso como solvente de para as reacções de activação do ácido fólico:

- Por não ser um solvente orgânico, solubiliza o ácido fólico até concentrações bastante elevadas (na ordem de 100 mM), ainda que com recurso a períodos prolongados de agitação.
- É miscível com solventes aquosos, álcoois, acetona, éter, clorofórmio.
- Sendo um solvente aprótico, não possui grupos hidroxilo ou protões acídicos capazes de interferir nas reacções.

Uma das maiores desvantagens deste solvente é a sua elevada estabilidade térmica e enorme dificuldade de evaporação (a pressão de vapor deste composto à pressão atmosférica, a 20 °C é de apenas 59,4 Pa, enquanto a pressão de vapor de água nas mesmas condições é de 2300 Pa).

Esta elevada estabilidade traduz-se no ponto de ebulição de 189 °C à pressão atmosférica (1013,25 mBar). Para extrapolar os pontos de ebulição deste solvente para pressões mais reduzidas, recorreu-se a uma ferramenta *online* que calcula estes valores com base num ponto de ebulição conhecido e no valor de entalpia de evaporação da substância ($\Delta H_{vap}^{DMSO} = 52,9 \text{ kJ/mol}$). A Figura 24 apresenta o diagrama de fase obtido.

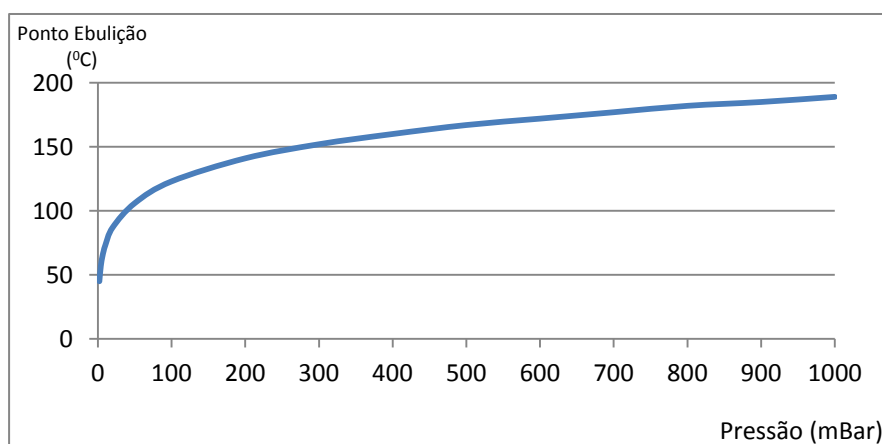



Figura 24: Diagrama de fase do dimetilsulfóxido (DMSO) (obtido através da ferramenta online: <http://www.trimen.pl/witek/calculators/wrzenie.html>)

A curva obtida é apenas uma previsão teórica do comportamento deste solvente a diferentes valores de pressão e não deve ser confundida com um estudo experimental deste parâmetro. No entanto, é possível prever que será necessário baixar a pressão para valores tao baixos como algumas dezenas de milibar para conseguir uma evaporação substancial a temperaturas inferiores a 100 °C.

Uma vez que será necessário evaporar este solvente numa dada altura da activação do ácido fólico (discutido mais adiante), fez-se um estudo preliminar da evaporação do DMSO à pressão controlada. Para tal, recorreu-se ao evaporador rotatório de pressão controlada.

Foi preparada uma solução de 25 mg/mL de ácido fólico (57 mM) num volume final de 2 mL de DMSO, num balão de fundo redondo, o qual foi montado no evaporador rotativo, de modo a entrar em contacto com o banho de água aquecido. A pressão e a temperatura foram variadas, como é representado na Tabela 8.

Tabela 8: Estudo da evaporação de 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), contendo 56 mM de ácido fólico

Pressão (mBar)	T °C	Tempo (min)	Observações
500	30	10	Sem alterações
400	30	10	Sem alterações
300	30	30	Sem alterações
40	40	60	Sem alterações
Introdução de um papel de filtro no esmerilado do balão para fazer circular ar, ajudando a evaporação			
420	70	60	Evaporação completa do DMSO

Como se pode observar, apenas se conseguiu a evaporação completa do DMSO usando condições extremas: temperatura bastante elevada (70 °C), pressão reduzida (420 mBar) e com o sistema de vácuo, de certa forma, aberto. O papel de filtro provoca uma abertura que permite a entrada de ar, que por correntes de convecção arrasta os vapores de DMSO no balão, ajudando no processo de evaporação. Estas condições não são favoráveis a ocorrência de reacções de activação do ácido fólico, como será mostrado de seguida. Elevadas temperaturas e entrada de ar (introdução de vapor de

água e alteração da pressão parcial de O_2), podem interferir com o processo, comprometendo a formação do produto final.

2.3. Activação do ácido fólico com um grupo sulfidrilo

A modificação química da molécula de ácido fólico de modo a ser possível ligar aos lipossomas passou por duas etapas:

1. Esterificação do ácido fólico com N-hidroxisuccinimida (NHS) para formar o ácido fólico-NHS (AF-NHS).
2. Substituição nucleofílica do AF-NHS com 2-aminoetanotiol (Cisteamina) para formar o ácido fólico modificado com um grupo sulfidrilo (AF-SH)

São duas reacções sequenciais, que no final resultam numa molécula de ácido fólico modificada com um grupo sulfidrilo ligado por um espaçador de 2 carbonos ao carboxilo na posição γ do domínio de ácido L-glutâmico (Figura 25)

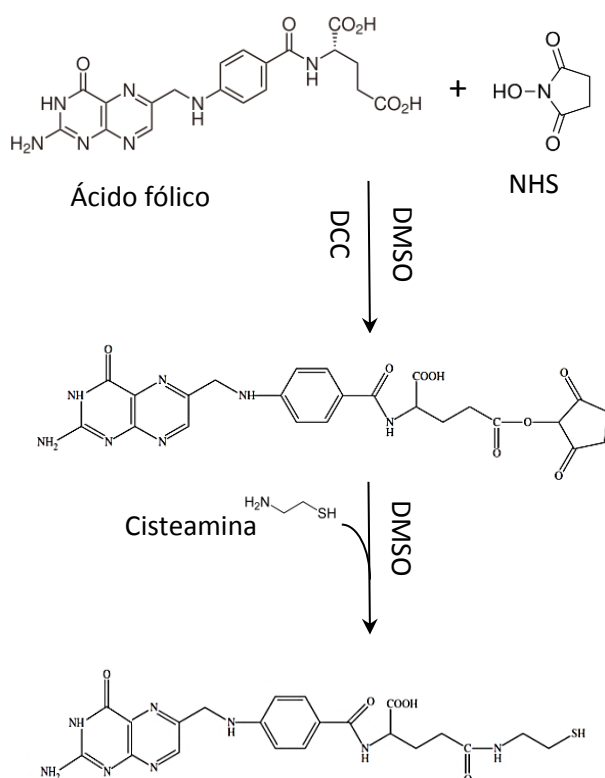


Figura 25: Reacção química de activação do ácido fólico com um grupo sulfidrilo (AF-SH). (DCC: díciclohexil carbodiimida, NHS: N-hidroxisuccinimida, DMSO: dimetilsulfóxido)

2.3.1. Esterificação do ácido fólico com NHS

Dissolveu-se 0,050 g (0,113 mmol) de ácido fólico em 2 mL de DMSO num balão de fundo redondo. Embora este composto apresente uma elevada solubilidade neste solvente, o processo de dissolução é bastante demorado e necessita de agitação permanente. A dissolução ocorreu à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante a noite com a ajuda de um agitador magnético (balão envolvido em papel de alumínio para evitar a fotodegradação). A solução de DMSO adquiriu uma cor amarelo-alaranjada límpida (Figura 27 a.).

De seguida, adicionou-se 0,026 g (0,226 mmol) de NHS, 0,025 g (0,122 mmol) de diciclohexil carbodiimida (DCC) e 25 µL de trietilamina (TEA). Deixou-se a reacção ocorrer no escuro, durante a noite (18 h) à temperatura ambiente. O mecanismo de reacção principal está representado na Figura 26.

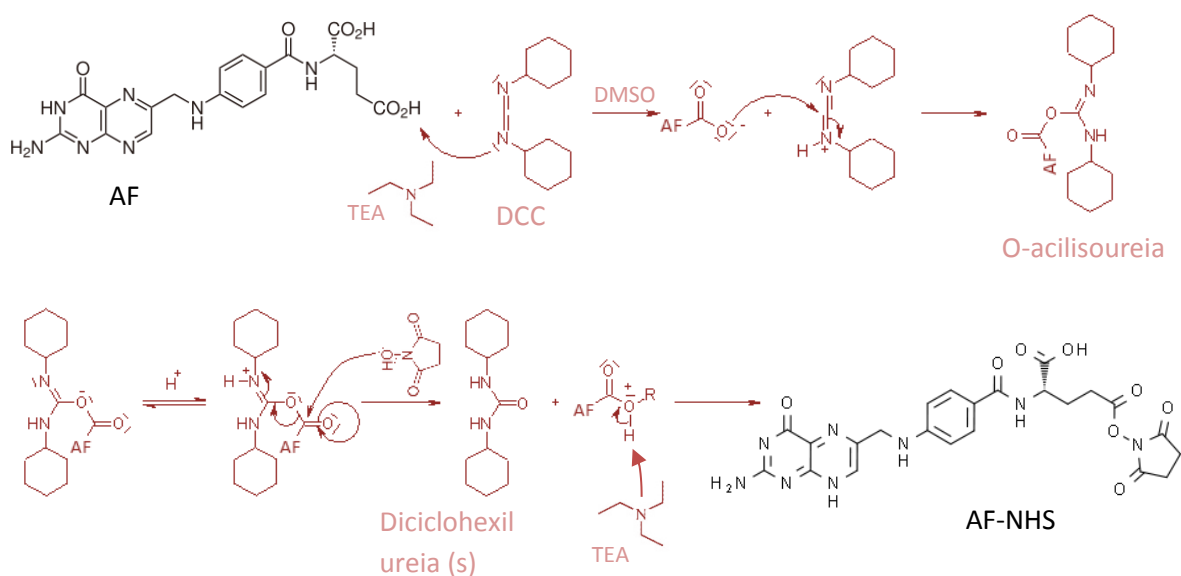


Figura 26: Mecanismo de reacção de esterificação do ácido fólico (AF) com N-hidroxissuccinimida (NHS). TEA: trietilamina, DCC: diciclohexil carbodiimida, DMSO: dimetilsulfóxido

Como produto da reacção, forma-se AF-NHS e diciclohexil ureia, um produto secundário insolúvel na maior parte dos solventes (incluindo o DMSO). Como se pode observar na Figura 27 b. A solução adquire um aspecto turvo, o que poderá ser considerado como a primeira indicação da ocorrência da reacção de esterificação.

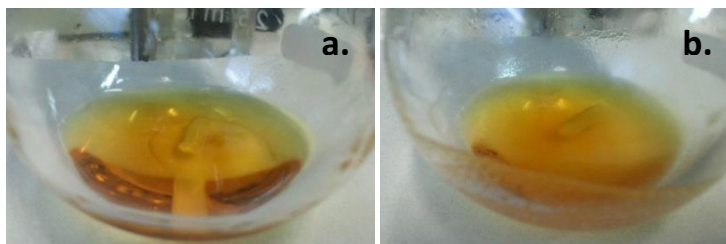


Figura 27: Fotografias do balão de fundo redondo contendo ácido fólico em dimetilsulfóxido (DMSO) (a.) e mistura reaccional de ácido fólico, diciclohexil carbodiimida (DCC), N-hidroxisuccinimida (NHS) e trietilamina (TEA) após 18 h de reacção à temperatura ambiente (b.)

Para além da observação do precipitado ao fim de 18 h de reacção, foram feitos mais dois testes para confirmar a presença do produto de interesse desta primeira etapa: seguimento da reacção usando a técnica de cromatografia de camada fina (TLC) e um método espectrofotométrico para detectar a presença de NHS livre em solução.

2.3.1.1. Optimização da técnica de cromatografia em camada fina (TLC)

A técnica de TLC é muito usada na detecção e separação de diferentes vitaminas (incluindo as da família B₉), extraídas de diversas fontes alimentares.^{77,78,89}

Vários estudos demonstraram uma boa separação de folatos usando fases estacionárias de sílica impregnadas com diferentes iões metálicos divalentes (Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺). Neste trabalho, usou-se a fase estacionária de Silica Gel G-60 F254 e a fase móvel foi optimizada de modo a obter a melhor separação de diferentes produtos das reacções.

Foram testadas 15 diferentes misturas de fase móvel até se obter a melhor separação dos produtos da reacção, bem como dos reagentes presentes na mistura. De seguida, apresentam-se as placas de TLC sob a forma de esquemas, juntamente com as respectivas fases móveis. As amostras de AF ou AF-NHS (após 18 h de reacção) em DMSO foram diluídas em Metanol:H₂O 3:1 (v/v) e aplicadas em placas de sílica, como é mostrado nas figuras seguintes (aplicou-se 5 µL de cada diluição em Metanol:H₂O). As placas foram visualizadas sob uma lâmpada de raios ultravioleta.

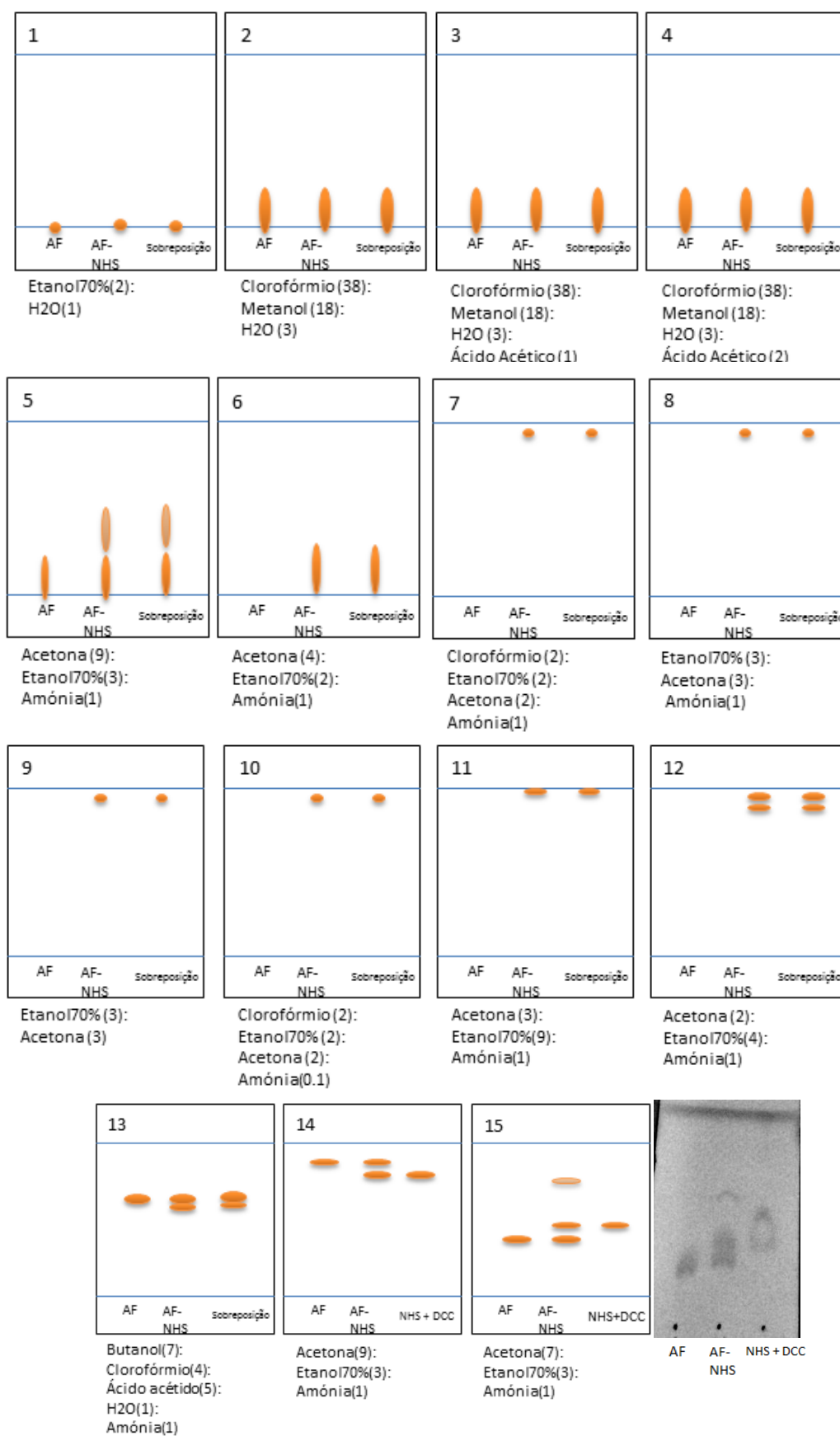


Figura 28: Diagramas representativos dos resultados de comatografia em camada fina (TLC) de ácido fólico (AF), AF após a reação com N-hidroxissuccinimida (NHS), formando o composto AF-NHS e os reagentes NHS e diciclohexil carbodiimida (DCC), usando diferentes fases móveis (entre parêntesis está indicada a proporção volumétrica do respectivo componente).

A escolha das fases móveis foi feita com base na solubilidade relativa de cada um dos componentes da mistura reaccional em diferentes solventes. Com a mistura 14 foi possível obter duas manchas perfeitamente delimitadas e separadas na placa. No entanto, como se pode observar na Figura 28, a mancha com o factor de retenção mais baixo na pista relativa a AF-NHS também aparece quando se aplicam apenas os reagentes NHS e DCC (sem ácido fólico). Isto indica que não é possível separar estes compostos, usando esta fase móvel. Por outro lado, o resultado da TLC usando a mistura 15 apresenta 3 manchas distintas na pista relativa a AF-NHS, sendo a de menor factor de retenção correspondente ao ácido fólico, a seguinte correspondente aos reagentes NHS e DCC e a de maior factor de retenção correspondente ao produto da reacção (AF-NHS). Esta mistura de solventes foi escolhida como fase móvel para monitorização da reacção por TLC.

2.3.1.2. Identificação de ácido fólico-NHS (AF-NHS) por hidrólise alcalina

A molécula de N-hidroxysuccinimida livre em solução apresenta uma absorvência elevada na região de 260 a 280 nm ($\epsilon_{260\text{nm}} = 9700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em NH_4OH). Quando ligada, por uma ligação éster a um carboxilo, a sua absorvência é reduzida.

Os ésteres de NHS são bastante estáveis em solventes apróticos como o DMSO. No entanto, a sua hidrólise torna-se bastante rápida em solventes aquosos a pH alcalinos (meia vida de éster de NHS de algumas horas a pH 7 e de apenas alguns minutos a pH 9).⁷⁶ Este facto é explorado em química de síntese que envolve estas espécies, de forma a identificar a presença deste tipo de ésteres (Figura 29).

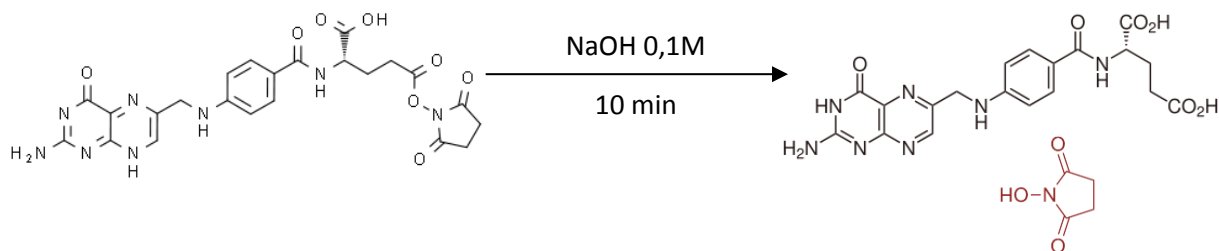


Figura 29: Esquema da reacção de hidrólise do ácido fólico esterificado com N-hidroxysuccinimida (AF-NHS) em solução alcalina

A dissolução destes compostos em solventes aquosos, comparando as absorvências a 260 nm antes e depois da adição de NaOH consiste num método de detecção da presença deste produto.

Neste trabalho, recolheu-se uma amostra da mistura reaccional (após 18 h de reacção), diluiu-se de 1:2500 (v/v) em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0 e mediu-se a absorvência da solução a 260 nm. Após a adição de 30 µL de NaOH 0,1 M e um período de espera de 10 minutos, voltou-se a medir a absorvência da solução (Tabela 9).

Tabela 9: Valores de absorvência a 260 nm antes e após a hidrólise alcalina do éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) do ácido fólico (AF-NHS)

	Abs 260 nm
AF-NHS	0,332
AF-NHS + NaOH	0,820

Observou-se um considerável aumento de absorvência, o que é um indicador de presença de ésteres de NHS em solução. Uma vez que o ácido fólico, bem como as restantes espécies presentes em solução também absorvem a este comprimento de onda, não é possível fazer medidas quantitativas de NHS libertado após a hidrólise. Apesar disso, com os dados reunidos de três observações independentes (presença de precipitado ao fim de 18 h de reacção, aparecimento de uma mancha nova na placa de TLC e resultado positivo do método de hidrólise alcalina) é possível inferir que estamos na presença do produto desta primeira etapa de activação de ácido fólico (ácido fólico esterificado com N-hidroxisuccinimida – AF-NHS).

Os resultados obtidos com TLC indicam a formação de um novo produto desta primeira reacção, no entanto também foi possível observar uma mancha de dimensão considerável com o factor de retenção igual ao controlo negativo (ácido fólico antes da reacção).

Com o intuito de melhorar o rendimento da reacção, prepararam-se quatro misturas reaccionais, onde se alteraram diferentes parâmetros, como é mostrado na Tabela 10.

Tabela 10: Diferentes condições experimentais da reacção de esterificação de ácido fólico com uma molécula de N-hidroxisuccinimida (NHS)

Balão	1	2	3	4
AF (g)	0,05	0,05	0,05	0,05
DMSO (mL)	2	2	2	2
agitar no escuro durante a noite				
TEA (μ L)	-	-	25 (30 min)	25 (30 min)
DCC (g)	0,025	0,025	0,025	0,025
NHS (g)	0,026	0,026	0,026	0,026
TEA (μ L)	25	25	-	-
agitar no escuro durante a noite				

AF – Ácido Fólico, DMSO – dimetilsulfóxido, TEA – trietilamina, DCC – diciclohexil carbodiimida.

Nesta primeira reacção, escolheu-se testar o efeito da ordem de adição de TEA na mistura reaccional. O papel desta espécie nesta reacção é de um aceitador de protões, aquando da ionização do AF e da desprotonação do produto final (Figura 26). A ordem de adição deste catalisador poderá ter um efeito importante na reacção, na medida em que poderá ser necessário uma desprotonação total do AF antes da reacção. A Tabela 10 apresenta o procedimento experimental de preparação das quatro misturas reaccionais: nos balões 1 e 2 TEA foi adicionada a seguir a todos os reagentes e nos balões 3 e 4, esta foi adicionada logo após a dissolução de AF e a mistura foi incubada durante 30 minutos no escuro com agitação.

Após 18 h de reacção, as amostras foram diluídas em Metanol:H₂O (3:1, v/v) e aplicadas numa placa de TLC, como explicado anteriormente. Os resultados estão apresentados na Figura 30.

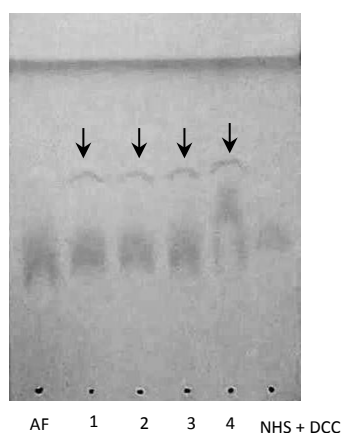


Figura 30: Fotografia da placa de cromatografia em cada fina (TLC) das amostras de diferentes misturas reaccionais (1 a 4, ver Tabela 10) após 18 h de reacção à temperatura ambiente e no escuro. NHS: N-hidroxisuccinimida, DCC: diciclohexil carbodiimida, AF: ácido fólico

Como se pode observar, todos as misturas reaccionais deram origem à nova mancha com factor de retenção mais alto (indicadas com setas), o que sugere que a ordem de adição da TEA não é relevante para esta reacção. Não houve diferenças na migração dos compostos das misturas reaccionais 1, 2 e 3. Na pista relativa ao balão 4, observou-se um arrastamento da banda intermédia (relativa a NHS e DCC), bem como o arrastamento da banda relativa ao AF. Uma vez que a banda com o maior factor de retenção também apresenta uma maior migração em relação as restantes, é provável que estas diferenças sejam devidas a artefactos experimentais, como o modo de aplicação da amostra ou algumas irregularidades/impurezas presentes nessa região da placa. É também evidente que o composto de partida (AF) não foi totalmente gasto nesta reacção, o que indica que esta não é completa. Para além disso, a nova macha formada é relativamente pequena e fina, o que pode ser uma consequência de baixo rendimento. Isto pode ser explicado pela ocorrência de reacções em competição com a principal ou equilíbrios químicos desfavoráveis à formação de produto.

A reacção de esterificação de AF com NHS (ou outros álcoois), com o uso de DCC é uma reacção conhecida como a esterificação de Steglich.⁹⁰ Um dos problemas deste tipo de reacções é a formação de um intermediário estável entre a DCC e o ácido. Um défice de protonação das aminas da DCC leva a que o intermediário O-acilisoureia possa sofrer uma reacção intramolecular isomerizando para N-acilisoureia, uma amida não reactiva com álcoois (Figura 31 a.).

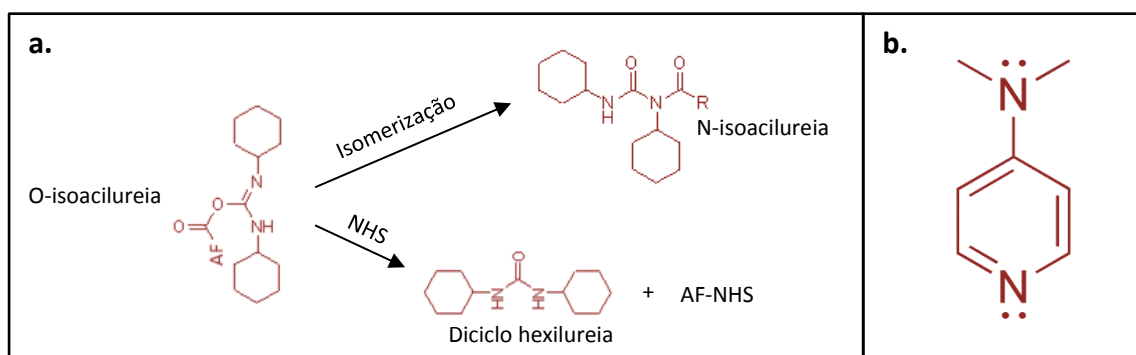


Figura 31: **a.** Esquema de possíveis reacções a partir de O-acilisoureia, um intermediário reactivo formado durante a esterificação de ácidos carboxílicos com álcoois; **b.** estrutura química de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). NHS: N-hidroxisuccinimida, AF-NHS: éster de NHS do ácido fólico

Para evitar esta isomerização, é comum usar-se um outro catalisador: 4-dimetilaminopiridina (DMAP, Figura 31 b.), um derivado de piridina que actua como um “transportador” do ácido carboxílico do intermediário reactivo O-acilisoureira para o álcool de interesse. Uma vez que os grupos amina são mais nucleofílicos em relação aos grupos hidroxilo, o DMAP funciona como um bom catalisador desta reacção na medida em que reage com O-acilisoureira, formando uma amida reactiva, facilitando o ataque nucleofílico do álcool. Esta poderá ser uma boa abordagem para aumentar o rendimento da reacção num trabalho futuro.

O interesse principal do presente trabalho é acoplar o AF aos lipossomas na proporção que é ditada pelos grupos reactivos presentes à superfície dos lipossomas. Um baixo rendimento da activação do AF não implica necessariamente impossibilidade de acoplamento aos lipossomas, pois basta haver uma pequena percentagem de moléculas activadas para ocupar os grupos reactivos e, conseqüentemente para haver acoplamento, não se tornando o rendimento crítico. Por isso optou-se por continuar a reacção mesmo com baixo rendimento.

2.3.2. Substituição nucleofílica de ácido fólico-NHS (AF-NHS) com cisteamina

A segunda reacção de activação de ácido fólico passa pela substituição nucleofílica do éster de NHS formado no passo anterior com o grupo amina da cisteamina, como é representado na Figura 32.

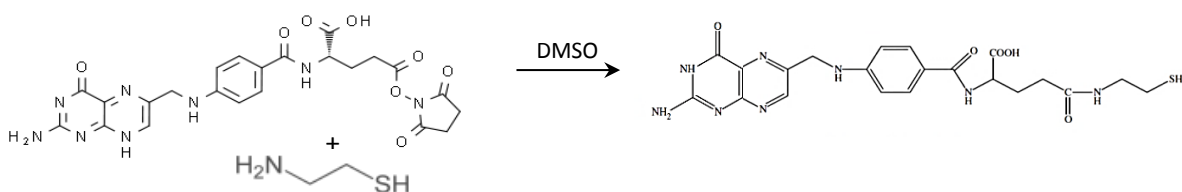


Figura 32: Esquema de reacção de substituição nucleofílica de éster de N-hidroxisuccinimida do ácido fólico com uma molécula de cisteamina formando-se ácido fólico-cisteamina (AF-SH) em dimetilsulfóxido (DMSO)

O grupo N-hidroxisuccinimidil é um bom grupo abandonante, uma vez que é estabilizado por ressonância na sua forma livre (N-hidroxisuccinimida). Uma vez que o grupo amina da cisteamina é um nucleófilo forte, a substituição dá-se espontaneamente, dando origem a uma amida estável, estabilizada por ressonância.

Para a optimização deste passo, procedeu-se à reacção de substituição com as 4 misturas reaccionais preparadas anteriormente (Tabela 10), segundo o procedimento da Tabela 11.

Tabela 11: Diferentes condições experimentais da reacção de esterificação de ácido fólico com uma molécula de N-hidroxisuccinimida (NHS), seguida da reacção de substituição nucleofílica com cisteamina

Balão	1	2	3	4
AF (g)	0,05	0,05	0,05	0,05
DMSO (mL)	2	2	2	2
Agitar no escuro durante a noite				
TEA (μL)	-	-	25 (30 min)	25 (30 min)
DCC (g)	0,025	0,025	0,025	0,025
NHS (g)	0,026	0,026	0,026	0,026
TEA (μL)	25	25	-	-
Agitar no escuro durante a noite				
Filtrar as misturas				
Evaporar a TEA				
V final (mL)	1,7	1,9	1,8	1,8
TEA (μL)	850	25	900	25
Cisteamina (g)	0,0075	0,0084	0,0079	0,0079

AF – Ácido Fólico, DMSO – dimetilsulfóxido, TEA – trietilamina, DCC – dicitclohexil carbodiimida.

Cada uma das misturas reaccionais (após 18 h de reacção de esterificação) foi filtrada, usando um a seringa e um filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 μm de diâmetro de poro.

Segundo o protocolo de activação de AF encontrado na literatura, após a filtração da mistura reaccional, o DMSO é evaporado à securo sob vácuo e o produto é redissolvido numa mistura de DMSO:TEA 2:1 (V/V).

Dado que a evaporação do DMSO é um processo que requer condições de temperatura e pressão bastante extremas (ver secção de estudo das propriedades físico-químicas do

dimetilsufóxido) e porque este processo pode introduzir água no sistema, optou-se por evaporar apenas o catalisador presente em solução, a TEA. O papel deste composto nesta segunda reacção também é de base, para prevenir a protonação da cisteamina por parte do AF, facilitando, assim, a reacção de substituição. A evaporação da TEA e a sua introdução de novo na mistura garante a funcionalidade deste composto na catálise da reacção (TEA poderá estar na forma protonada, como resultado da reacção anterior).

Para além desta alteração ao protocolo original, estudou-se o efeito da quantidade de TEA na segunda reacção. Assim, como é mostrado na Tabela 11, nas reacções 1 e 3 adicionou-se um volume de TEA para formar uma mistura 2:1 (v/v) (como é indicado no protocolo original da literatura) e nas 2 e 4, adicionou-se uma quantidade catalítica, tal como no primeiro passo de activação.

A quantidade de cisteamina (massa molecular = 77,15 g/mol) adicionada corresponde a razão molar de 1:1 em relação ao AF presente em solução.

A reacção foi monitorizada usando a técnica de TLC e o método de Ellman. Como controlo para o método de Ellman, foi preparada uma solução de cisteamina em DMSO, de modo a observar a evolução dos grupos sulfidrílo intactos em solução.

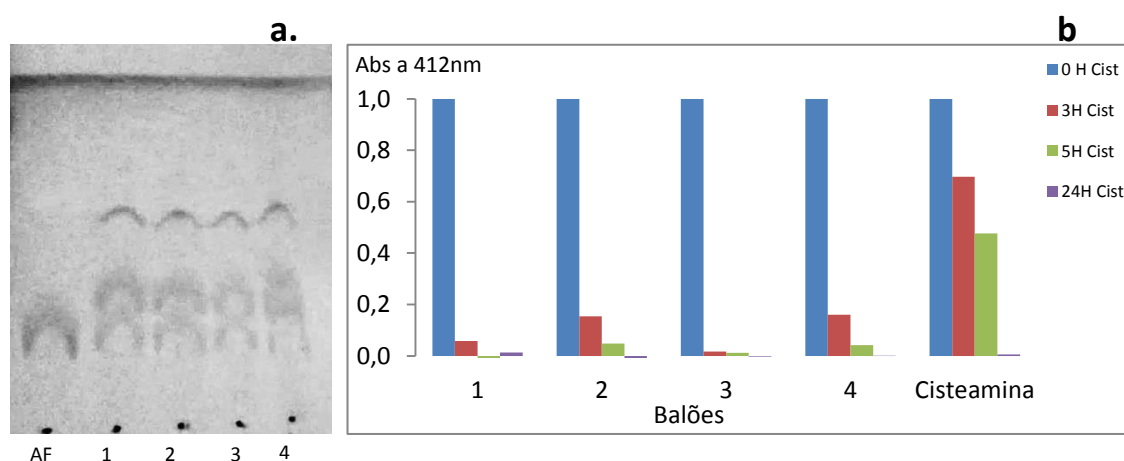


Figura 33: **a.** Reacção de substituição nucleofílica do éster de N-hidroxisuccinimida de ácido fólico (AF-NHS) com cisteamina, monitorizada por cromatografia em camada fina (TLC), após 5 h (os números representam as misturas reaccionais, ver Tabela 11 **b.** absorvência a 412 normalizada ao valor máximo após a aplicação do método de Ellman em diferentes misturas reaccionais

Após 5 h de reacção não houve aparecimento de manchas novas na placa de TLC, como se pode ver na Figura 33 a. Também não houve alterações no padrão de migração das bandas após 24 h de reacção com cisteamina (resultados não apresentados), o que poderá dever-se a várias razões. Em primeiro lugar, é possível que a reacção de substituição tenha ocorrido com um rendimento bastante baixo, formando uma quantidade de produto não detectável pela técnica de TLC. Por outro lado, AF-SH e AF original não apresentam diferenças significativas na polaridade. A introdução de um grupo sulfidrilto provavelmente não altera em grande escala a interacção do AF com a fase móvel e a fase estacionária usadas nesta abordagem. Uma polaridade semelhante implica factores de retenção parecidos, resultando numa fraca resolução destes dois compostos por TLC.

O resultado espectável da detecção de grupos sulfidrilto ao longo da reacção de substituição nucleofílica seria um nível constante de absorvência (não há diminuição de tióis totais, uma vez que o grupo reactivo da cisteamina é o seu grupo amina). Contudo, não foi o que se observou usando o método de Ellman. Logo é provável que haja uma elevada taxa de oxidação dos grupos sulfidrilto para formar ligações persulfureto entre diferentes moléculas. A diminuição da absorvência foi mais acelerada nas condições com as misturas reaccionais em relação à cisteamina dissolvida em DMSO (Figura 33 b.). Mais precisamente, os balões contendo menores quantidades de TEA demonstraram maiores valores de absorvência em relação às misturas com maiores quantidades deste composto. Este dado sugere uma oxidação mais acelerada de grupos sulfidrilto na presença de TEA. Por esta razão, a mistura reaccional escolhida para avançar com a ligação do AF aos lipossomas foi a mistura correspondente balão às condições 4.

2.3.3. Rendimento da reacção

De modo a calcular o rendimento geral da reacção de activação do AF, optou-se por calcular a razão grupos SH/AF após a activação. Para tal, doseou-se o AF por espectrofotometria de absorção (neste caso a concentração deste composto é elevada o suficiente e não é necessário recorrer à espectroscopia de fluorescência) e os tióis totais presentes em solução, usando o método de Ellman. (ver na secção de materiais e métodos). A amostra foi diluída em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0 e leu-se a absorvência a 360 nm (uma vez que apenas o ácido fólico absorve a este comprimento de onda)

Usou-se a curva padrão obtida medindo a absorvência a 360 nm de diferentes diluições de ácido fólico, com a seguinte equação: $Abs_{360nm} = 0,0077[AF](\mu M) - 0,0213$ ($R^2 = 0,9951$). Para o doseamento de grupos SH, aplicou-se o método de Ellman. Os resultados deste doseamento estão representados na Tabela 12.

Tabela 12: Valor de concentração de ácido fólico (AF) e de grupos SH (após a aplicação do método de Ellman) na amostra após a reacção de activação do com um grupo sulfidril

[AF] (amostra original) mM	41,4
[SH] (amostra original) mM	4,8
SH/AF	0,12

O rendimento de cerca de 12 % pode ser explicado pela rápida oxidação de grupos sulfidril e pode ser corrigido com uso de agentes redutores comuns.

A redução dos grupos SH após a activação do ácido fólico foi garantida com o uso do agente redutor TCEP (ver introdução) pelo facto de não possuir átomos de enxofre e, consequentemente não interferir na reacção de conjugação entre AF-SH e grupos maleimida dos lipossomas.

A solução de trabalho deste reagente foi preparada em tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH ajustado para 6,0 após a adição de TCEP (composto ácido que baixa demasiado o pH da solução após a sua dissolução).

Após o último passo de activação do AF, adicionou-se o reagente TCEP à mistura reaccional na proporção 1:1,3 (mol AF:TCEP) e incubou-se durante 1 hora à

temperatura ambiente. A reacção de redução segue o mecanismo representado na Figura 34.

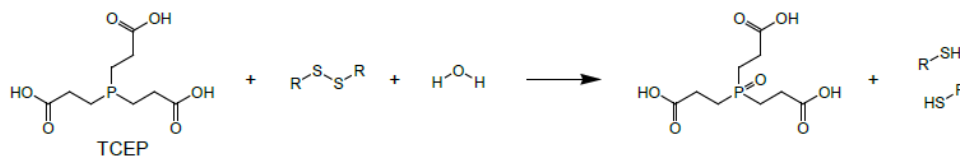


Figura 34: Esquema de reacção de redução de ligações persulfureto, usando tris-2-carboxietil fosfina (TCEP)

O uso de TCEP inviabiliza a detecção de tióis em solução, uma vez que ele próprio reduz o reagente de Ellman (DTNB), resultando num falso positivo. A eficácia de activação do AF será inferida a partir dos resultados de acoplamento aos lipossomas, como será discutido mais adiante.

Esta reacção de activação foi escolhida pelo facto de dar origem a um produto que contém um grupo SH, que é bastante útil na ligação selectiva a grupos maleimida. Existem diferentes métodos de abordar o problema da ligação de AF aos lipossomas. Como já foi demonstrado na introdução, um catálogo alargado de DSPE-PEG funcionalizado com diferentes grupos reactivos possibilita uma grande flexibilidade de estratégias de ligação. Neste trabalho optou-se por activar o AF com um grupo SH e acopla-lo ao DSPE-PEG-maleimida pela eficácia e especificidade de ligação entre tióis e grupos maleimida, pela estereoespecificidade de activação do AF e pela estabilidade dos intermediários durante a activação desta molécula.

A adição de uma molécula de cisteamina especificamente ao carbonilo na posição γ do AF é um processo químico que necessita de ter alguns cuidados. Uma vez que o intermediário O-acilisourea é muito mais reactivo com aminas do que com álcoois, poder-se ia obviar o passo de formação de AF-NHS e seguir directamente para a formação de AF-SH, usando a mesma abordagem de síntese com DCC. No entanto, esta estratégia não garante que a ligação ocorra no carboxilo terminal da molécula, podendo resultar em AF com baixa ou nenhuma afinidade para os receptores de folato. Gabizon e colegas demonstraram que a ligação de AF a DSPE-PEG-amina pelo processo de síntese com DCC resulta em 90 % de ligação de AF no carbonilo γ .⁴⁷ A estereoespecificidade neste caso pode ser garantida pelo tamanho do polímero impedindo o acesso da amina terminal ao carbonilo α do ácido fólico. No caso do

presente trabalho, uma molécula tão pequena como cisteamina poderá resultar numa maior percentagem de substituição no carbonilo α .

Outro atalho possível de seguir nesta síntese, seria o uso de AF-NHS, cuja síntese foi confirmada por 3 diferentes métodos, directamente aos lipossomas contendo DSPE-PEG-amina. Esta técnica é comum na síntese de lípidos funcionalizados com AF, no entanto todo o processo ocorre no mesmo solvente (geralmente DMSO), resultando no lípido funcionalizado que necessita de ser extraído para preparar os lipossomas. Como o objectivo principal deste trabalho consiste numa abordagem mais inovadora, seria necessário introduzir ácido fólico-NHS à suspensão (aquosa) de lipossomas com DSPE-PEG-amina. Como já foi explicado, os ésteres de NHS são susceptíveis a hidrólise em soluções aquosas e, embora o pH do tampão usado na preparação de lipossomas estar perto da neutralidade (6,0), a reacção de hidrólise deste éster de AF entraria em grande competição com a ligação aos grupos amina do PEG.

Embora existam provas da síntese de AF-SH, este processo de activação necessita de ser optimizado de modo a aumentar o rendimento global. O uso de DMAP na primeira reacção é uma das possíveis estratégias. Para além disso, poder-se-ia testar uma estequiometria diferente na reacção entre AF-NHS e cisteamina (usar razões molares diferentes) ou testar as mesmas condições num solvente diferente, mais favorável à evaporação (possibilitando recriar melhor as condições encontradas na literatura).

Na grande maioria dos estudos onde se faz a síntese de lípidos funcionalizados com ácido fólico, a presença de produto final é confirmada pela técnica de ressonância magnética nuclear (NMR). Esta estratégia pode ser usada no trabalho futuro em vários passos da síntese (AF-NHS, AF-SH DSPE-PEG₂₀₀₀-AF) de modo a controlar cada etapa e resolver os possíveis problemas de rendimento que foram relatados nesta secção.

2.4. Ligação do Ácido Fólico aos Lipossomas

2.4.1. Preparação e caracterização de lipossomas de longo tempo de circulação

A caracterização e os estudos de internalização de lipossomas direccionados foram feitos tendo por base lipossomas de longo tempo de circulação sem qualquer tipo de ligando à superfície. Os lipossomas foram preparados segundo o procedimento apresentado na secção de Materiais e Métodos. A composição e proporção de lípidos foram optimizadas por estudos anteriores por Corvo e colegas⁹¹ que demonstraram elevados valores de estabilidade e bom perfil de biodistribuição destas formulações.

Os lipossomas foram preparados segundo o método de hidratação de filme lipídico, com tampão citrato 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,0 (para uma concentração final de 20 mM de lípido) e extrusados por filtros de polycarbonato sequenciais de poros de 600, 400, 200 e 100 nm, como explicado na secção de Materiais e Métodos. A suspensão lipossomal foi extrusada 3 vezes pelo filtro de 100 nm de modo a obter uma população de partículas o mais monodispersa possível, com um índice de polidispersão (PDI) baixo.

Após a sua preparação, os lipossomas foram caracterizados quanto ao seu tamanho e potencial ζ . O doseamento de fosfolípidos foi efectuado pelo método de doseamento de fosfatos, adaptado de Roussier e colegas.⁸² A extrapolação do valor de concentração de lípidos totais (incluindo colesterol) foi feita, admitindo que as razões molares de cada componente da mistura se mantêm constantes ao longo do processo de preparação de lipossomas.

Tabela 13: Valores de diâmetro hidrodinâmico, (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ) de lipossomas de longa circulação preparados. EPC: fosfatidil colina da lecitina de ovo, Chol: colesterol, DSPE-PEG₂₀₀₀: 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-poliétilenoglicol2000

Lipossomas	DH (μ m)	PDI	ζ (mV)
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ (Após a hidratação, MLV)	1,45	0,794	
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ (Filtro de 600 nm)	0,98	0,459	
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ (Filtro de 400 nm)	0,52	0,288	-
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ (Filtro de 200 nm)	0,24	0,193	
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ (3 vezes filtro de 100 nm)	0,14	0,081	-1,5

A homogeneização e dimensionamento da suspensão de lipossomas através da extrusão permite obter medidas reprodutíveis de tamanho abaixo de 0,15 μ m de diâmetro, com PDI bastante baixo, como se pode observar na Tabela 13. Valores de PDI admitidos para tamanhos medidos usando os instrumentos de Malvern™ podem variar entre 0 e 1, sendo valores abaixo de 0,2 considerados como bons indicadores de populações homogêneas. Como se pode observar pelos resultados, à medida que se reduz o tamanho do poro, reduz-se o tamanho das partículas, juntamente com o respectivo valor de PDI, o que indica que se forma uma população de partículas cada vez mais homogênea.

Uma vez que se usaram lípidos neutros na formulação, juntamente com o revestimento com PEG₂₀₀₀, que neutraliza a carga até de lípidos carregados, o potencial ζ dos lipossomas está perto da neutralidade (valores até ± 4 mV são considerados como neutros).

2.4.1.1. Optimização da ligação do ácido fólico aos lipossomas

A ligação de ácido fólico activado, AF-SH, foi feita pela adição de diferentes quantidades deste composto após a reacção de activação aos lipossomas em suspensão contendo DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida. A formulação lipossomal usada neste caso foi EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (razão molar 68,25:30,5:0,55:0,7). A percentagem de grupos maleimida foi escolhida com base na optimização do protocolo de acoplamento covalente de superóxido dismutase aos lipossomas com a mesma formulação, desenvolvido por Corvo e colegas e com base nos valores de DSPE-PEG-AF usados na literatura^{47,88,91}, onde este valor varia entre 0,5 e 1 % mol em relação ao lípido total.

Após a activação do ácido fólico, o AF-SH foi purificado por cromatografia de exclusão molecular, de modo a separá-lo dos restantes componentes da mistura, nomeadamente da cisteamina livre que poderá competir com a ligação do AF-SH aos grupos maleimida. O perfil de eluição tipo da mistura reaccional no final da reacção está representado na Figura 35.

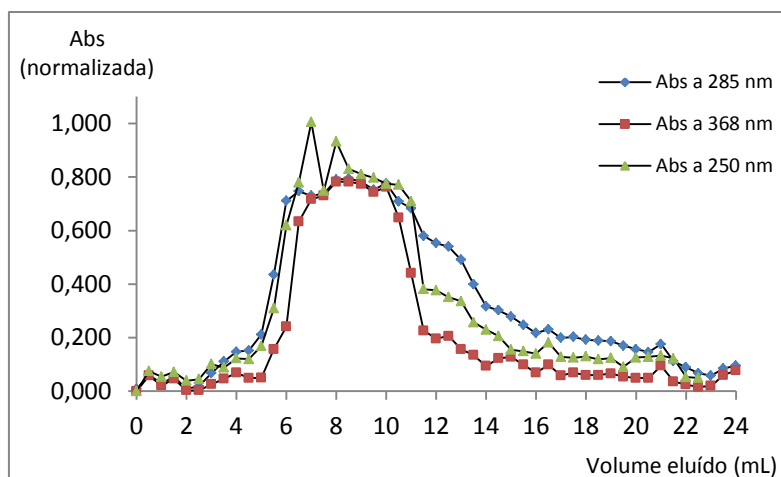


Figura 35: Perfil de eluição de ácido fólico (368 nm), dimetilsulfóxido 10 % (v/v) (DMSO) (250 nm) e cisteamina (285 nm), usando a coluna Econopac 10 DG (limite de exclusão 6 kDa)

Como se pode observar, o AF (massa molecular = 441,4 Da, seguido com leituras de absorvência a 368 nm) começa a eluir a um volume de eluição de 6 mL de tampão aplicado na coluna. Uma vez que este composto também absorve fortemente a 250 e 285 nm, também há um elevado aumento de absorvência nesta fracção. A absorvência a 368 nm baixa aos 12 mL de volume de eluição, havendo uma prevalência dos valores de absorvência a 250 e 285 nm. Isto indica que a cisteamina, seguida pela absorvência a 285 nm (massa molecular = 77,15 Da) e o DMSO, absorvência a 250nm, (massa molecular = 78,13 Da) ficam retidos mais tempo na coluna. No entanto, a resolução desta técnica, recorrendo à coluna Econopac 10 DG, não permite separar os compostos em questão, pelo que se escolheu adicionar AF activado aos lipossomas, sem recorrer à cromatografia de exclusão molecular.

Os lipossomas para a ligação do AF foram preparados segundo o mesmo procedimento que os lipossomas não direccionados. A adição de AF activado e reduzido com TCEP foi feita com duas proporções diferentes. A quantidade de grupos sulfidrilos em relação aos grupos maleimida durante a ligação foram adicionados na mesma estequiometria (1:1)

ou na estequiometria de 4 grupos SH para 1 grupo maleimida. Os resultados de doseamento de grupos SH no final da activação sugerem um rendimento global de reacção na ordem dos 10 %. Por este motivo, as razões molares de AF:grupos maleimida testadas foram respectivamente 10:1 e 40:1. Como controlo de interacções inespecíficas, o AF foi adicionado na mesma proporção aos lipossomas de longo tempo de circulação, sem grupos maleimida.

Após a adição do AF aos lipossomas, o pH da mistura foi ajustado para 7 (pH óptimo de reacção SH – maleimida entre 6,5 e 7,5) e esta foi incubada durante a noite com agitação. O excesso de AF (e outros compostos de baixa massa molecular) foi removido por cromatografia de exclusão molecular, usando a coluna Econopac 10 DG.

2.4.1.2. Caracterização dos lipossomas direccionados

Os lipossomas foram caracterizados quanto ao seu tamanho, carga e quantidade de AF presente após a ligação. Estes factores foram medidos em lipossomas sem grupos maleimida, que serviram como controlo da experiência e em lipossomas contendo DSPE-PEG-mal antes e depois da reacção de ligação.

Tabela 14: Valores de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ) de lipossomas de longa circulação e de lipossomas com maleimida antes e depois da reacção de ligação com ácido fólico activado (valores apresentados sob a forma de intervalo de medições de 4 experiências independentes)

Lipossomas	DH (μm)	PDI	ζ (mV)
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀	0,13 – 0,15	0,066 – 0,081	-1,5
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -mal (antes da reacção)	0,13 – 0,14	0,072 – 0,078	-0,5
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ (mal : AF 1:10)	0,13 – 0,14	0,043 – 0,070	-3,0
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ (mal : AF 1:40)	0,13 – 0,15	0,048 – 0,105	-3,7
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -mal (mal : AF 1:10)	0,14 – 0,15	0,049 – 0,087	0,1
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -mal (mal : AF 1:40)	0,13 – 0,14	0,057 – 0,082	-1,0

Os valores do potencial ζ são modas de um conjunto de 100 medições (são registados os valores mais estáveis após uma corrida de 100 medições da amostra). EPC: fosfatidil colina da lecitina de ovo, Chol: colesterol, DSPE-PEG₂₀₀₀: 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-poli(etilenoglicol)2000 (mal: maleimida)

A ligação do AF aos lipossomas não alterou significativamente as suas características, como se pode observar na tabela 14. Os valores de potencial ζ continuam perto da neutralidade após a reacção, bem como os respectivos tamanhos, permanecendo < 0,15 μm .

Tabela 15: valores de concentração do ácido fólico (AF) e de lípido total de lipossomas após a reacção de conjugação e após a purificação por cromatografia de exclusão molecular (intervalo de valores obtido com 4 ensaios independentes)

Maleimida : Ácido fólico total na reacção (mol)	Lipossomas sem maleimida			Lipossomas com maleimida	
	0	1 : 10	1 : 40	1 : 10	1 : 40
[AF] μ M	-	1,3 - 4,8	3,1 - 8,2	3,5 - 5,7	2,9 - 12,0
[Lípido] mM	4,85	4,8 - 5,3	4,1 - 5,0	4,0 - 4,4	4,5 - 5,0
AF/Lípido total (% mol)	-	0,03 - 0,09	0,08 - 0,16	0,09 - 0,13	0,06 - 0,24
AF/maleimida (% mol)	-	4,3 - 12,9	11,4 - 22,9	12,9 - 18,6	8,6 - 34,3

Foi possível detectar a presença de AF nos lipossomas após a sua purificação por cromatografia. Os lipossomas são estruturas com raio hidrodinâmico bastante elevado, pelo que são eluídos da coluna no seu volume morto. Por outro lado, o AF livre, sendo uma molécula pequena, fica retido na coluna, possibilitando a separação completa destas duas entidades. O AF detectado em lipossomas após a sua passagem pela coluna e lise com detergente não resulta da co-eluição de moléculas livres em solução.

O lípido DSPE-PEG-maleimida é inserido na membrana lipossomal durante a sua formação com uma orientação aleatória. É expectável que os lipossomas apresentem alguma percentagem de grupos maleimida orientados para o interior dos lipossomas. Uma vez que na formulação usada adicionou-se 0,7 % (mol) de DSPE-PEG-maleimida, são expectáveis valores de percentagem de AF abaixo deste valor devidos não só ao baixo rendimento de ligação, como também à percentagem de grupos maleimida não disponíveis para a recção. Isto torna os valores obtidos bastante razoáveis (Tabela 15). Como se pode observar nesta tabela, o intervalo de concentrações de AF detectado é bastante alargado tanto no caso dos lipossomas “brancos” como no caso dos lipossomas contendo maleimida, indicando que a reprodutibilidade do método necessita de ser optimizada. Apesar disso, observa-se uma tendência para existir maiores quantidades de AF em lipossomas contendo maleimida (tanto na razão 1:10, como na razão 1:40).

Pode-se afirmar que existem interacções inespecíficas entre AF e a bicamada lipossomal, uma vez que também se detectou AF na mesma ordem de grandeza nos lipossomas sem maleimida. Uma explicação possível para este fenómeno reside no facto de o AF ser adicionado aos lipossomas dissolvido em DMSO.

As interações deste solvente com as bicamadas lipídicas e membranas biológicas têm sido alvo de muitos estudos, uma vez que ele é usado em amostras biológicas (como crioprotector de células) e até na indústria farmacêutica (como agente de permeabilização de pele na aplicação tópica de fármacos). Apesar dos esforços, muito pouco se sabe acerca do mecanismo molecular de interação do DMSO com os fosfolípidos de membrana. Estudos *in silico* demonstraram um aumento de permeabilidade de bicamadas de fosfolípidos à medida que se aumenta a percentagem de DMSO (acima de 10 % mol), por meio de formação de poros transientes ou até à desintegração completa da membrana para concentrações muito elevadas.^{92,93} Para concentrações mais baixas deste solvente, estudos de calorimetria indicam um aumento de T_m à medida que se aumenta a sua fracção molar⁴. As propostas de mecanismos moleculares consistem em analisar o efeito penetrante das moléculas de DMSO em bicamadas fosfolipídicas. A baixas concentrações, estas moléculas formam uma rede de ligações por hidrogénio entre os grupos polares de fosfolípidos, baixando a desordem orientacional destes constituintes de membrana. À medida que se aumenta a sua concentração, as moléculas de DMSO, penetram na bicamada, interagindo mais com os grupos polares, aumentando as suas repulsões (Figura 36) e levando à sua destabilização.

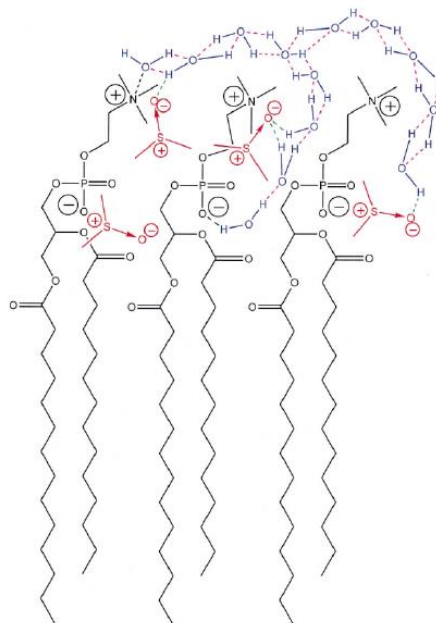


Figura 36: Possíveis interações entre uma membrana de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) e dimetilsulfóxido (DMSO) (citado de⁴)

No presente trabalho, as percentagens de DMSO usadas foram de 1,5 % (v/v) (no caso da razão molar maleimida : AF 1:10) e 6 % (v/v) (no caso da razão maleimida : AF 1:40). Durante a ligação do ácido fólico, a percentagem de DMSO nunca excedeu 6 % do volume total da solução, precisamente para evitar a destabilização da membrana lipossomal e como se pode ver na Tabela 14, os lipossomas mantiveram-se intactos após a reacção, não apresentando diferenças no seu tamanho ou carga. Apesar de não haver destabilização da bicamada lipossomal, é muito provável que esta tenha interagido com o DMSO presente em solução, levando a interações inespecíficas entre o AF dissolvido neste solvente e os lipossomas.

A síntese de compostos em fase heterogénea, isto é, ligação de moléculas em solução com nanopartículas sólidas é um processo bastante exigente do ponto de vista da síntese orgânica, como foi explicado na introdução. A este problema acrescenta-se o da baixa solubilidade do AF em solventes aquosos e a mudança de solvente de reacção (passagem de DMSO para tampão citrato). Devido a estes problemas, é mais frequente encontrar estudos onde se realiza primeiro a síntese de lípido funcionalizado com AF (em DMSO), seguido da sua purificação e inserção em lipossomas.

De forma a explorar opções adicionais de remoção de AF não ligado aos lipossomas após a reacção de ligação, testou-se também a técnica de ultracentrifugação. Os lipossomas, após uma diluição de cerca de 1:26 (v/v) foram centrifugados a 300 000 x g durante 2 h a 15 °C e os precipitados ressuspensos em tampão de preparação de lipossomas de modo a obter a mesma diluição que se obtém ao passa-los na coluna de exclusão molecular (diluição de cerca de 1:2). O doseamento de AF foi efectuado segundo o procedimento anterior.

Tabela 16: valores de concentração de ácido fólico (AF) e lípido em lipossomas após a reacção de conjugação e após a sua purificação por ultracentrifugação a 300 000 xg durante 2 h a 15 °C

		Lipossomas sem maleimida		Lipossomas com maleimida	
		0	1 : 10	1 : 10	1 : 40
Maleimida : Ácido fólico total (mol)					
[AF] µM	-	4,8	8,2	5,7	7,6
[Lípido] mM	4,9	5,3	5,0	4,4	4,5
AF/Lípido total (% mol)	-	0,09	0,16	0,13	0,17
AF/maleimida (% mol)	-	12,9	22,9	18,6	24,3

Como se pode observar na Tabela 16, não existem grandes diferenças de quantidade de AF doseado em lipossomas após a ultracentrifugação em relação ao AF doseado em lipossomas após a cromatografia de exclusão molecular. Também se mantém a semelhança entre os dois tipos de lipossomas usados no ensaio. Apesar de, aparentemente, não haver diferenças nos valores de ácido fólico, a purificação de lipossomas por ultracentrifugação demonstrou vantagens nos ensaios de internalização de lipossomas, como será discutido mais a frente (na secção de Internalização de Lipossomas em Células Tumerais).

É difícil tirar conclusões acerca da ocorrência da ligação covalente entre AF e lipossomas apenas com os resultados de doseamento desta molécula. As diferenças entre as interacções inespecíficas e ligação covalente podem não ser suficientes para causar um aumento significativo da intensidade de fluorescência detectada. Para além disso, o doseamento foi efectuado admitindo que as propriedades de fluorescência do AF se mantêm inalteradas após todo o processo de activação e consequente ligação aos lipossomas. Um desvio ou um decréscimo da intensidade de emissão de fluorescência após a modificação química da molécula podem causar valores aparentemente mais baixos.

Tanto o método de activação como o método de ligação do AF aos lipossomas precisam de trabalhos futuros de optimização. As possíveis estratégias para melhorar a activação foram explicadas na secção anterior. No que diz respeito ao acoplamento às nanopartículas, o problema mais evidente é a introdução de um solvente activo do ponto de vista de dinâmica membranar à suspensão lipossomal. A passagem de DMSO para qualquer outro solvente é um passo bastante complicado, uma vez que este tem um ponto de ebulição perto de 200 °C (à pressão atmosférica), não forma cristais aquando da sua congelação e é miscível com a maior parte de solventes orgânicos e aquosos. A extracção do AF activado do DMSO pode ser efectuada por diferentes métodos. Com a introdução de uma certa quantidade de água à mistura reaccional em DMSO, é possível congela-la e liofilizar o produto, recuperando ácido fólico-SH na sua forma cristalina. Pode-se recorrer também à diálise para mudar o solvente. Para além disso, as técnicas de HPLC, apesar de mais demoradas e exigentes, também o permitem.

O problema da baixa solubilidade do AF em solventes aquosos pode ser resolvido mudando o método de adição de AF activado (dissolvido em DMSO) aos lipossomas (em tampão). Neste trabalho, recorreu-se à adição *bolus* (no caso da razão molar maleimida:AF de 1:40 o volume adicionado foi de 100 μ L, para um volume final de reacção de 1,6 mL). Como resultado, observou-se a formação de um precipitado amarelo-alaranjado após a adição. Caso se abordasse este problema com o método de adição contínua de quantidades abaixo da concentração de saturação de ácido fólico, é espectável que o rendimento de ligação aumente bastante. A inovação do método aqui utilizado está precisamente em ultrapassar os problemas mencionados. Com o trabalho efectuado, foram dados passos importantes no sentido da implementação de um método de ligação novo.

3. Ligação do Antagonista G aos Lipossomas

A ligação do antagonista G aos lipossomas seguiu a mesma química usada na ligação do ácido fólico: reacção entre um grupo sulfidrilo do ligando e um grupo maleimida dos lipossomas (DPSE-PEG₂₀₀₀-maleimida). Na sua sequência (H-Arg-DTrp-N^{me}Phe-DTrp-Leu-Met-NH₂) este péptido não possui resíduos de cisteína, logo tem de ser activado previamente à ligação. O péptido foi tiolado e foi ligado aos lipossomas por dois métodos diferentes: o método da pós-inserção e o método directo.

O objectivo deste trabalho foi comparar a eficácia de ligação do péptido por dois métodos diferentes, possibilitando também avaliar de outra perspectiva o rendimento da reacção de ligação do AF efectuado anteriormente.

3.1. Activação do antagonista G com um grupo sulfidrilo

A química de activação do antagonista G é mais simples, comparativamente ao ácido fólico. Esta envolve apenas um passo de uma hora à temperatura ambiente após o qual o péptido pode ser ligado aos lipossomas, sem necessitar de purificação.

A tiolação do antagonista G foi feita por meio de 2-iminotiolano (reagente de Traut), uma molécula cíclica de tioimidato, reactiva com aminas primárias (Figura 37).

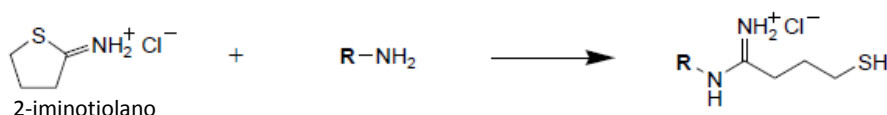


Figura 37: Esquema de reacção entre uma amina primária e 2-iminotiolano

Usando este reagente, o N-terminal do péptido foi modificado de modo a conter um grupo sulfidrílo capaz de reagir com um grupo maleimida. Apesar da reacção ser relativamente simples, para o seu sucesso é necessário controlar vários factores, como o pH do meio (esta dá-se preferencialmente a pH 8,0), a estequiometria (neste caso usou-se uma estequiometria de 4 moléculas de 2-iminotiolano para 1 molécula de péptido, de modo a garantir a activação de todas as moléculas de antagonista G em solução) e o recipiente onde a reacção ocorre. O péptido tem uma elevada tendência para interagir com o vidro, pelo que todos os recipientes onde este se encontre na forma livre, têm de estar revestidos por um composto que neutraliza os grupos de silanol do mesmo, tornando-os mais hidrófobos. O composto usado neste trabalho foi Sigmacote® (Sigma®), um polímero de organopolisiloxano em heptano, que reveste os recipientes de vidro de forma duradoura.

3.2. Ligação do antagonista G aos lipossomas

Tal como já foi referido, a ligação foi feita de duas formas diferentes. Em ambos os casos, a formulação lipossomal foi igual à usada para a ligação do AF – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DPSE-PEG₂₀₀₀-maleimida (68,30:30,5:0,55:0,70). No final da ligação, o péptido foi doseado por espectroscopia de fluorescência (dois resíduos de triptofano presentes na sequência do péptido possibilitam o uso desta técnica).

3.2.1. Método directo de ligação

Analogamente ao método de ligação do ácido fólico, a ligação do péptido activado realizou-se em lipossomas previamente formados, contendo grupos maleimida à superfície (com a razão molar indicada acima). O péptido foi adicionado na razão molar

de 1,4:1 em relação aos grupos maleimida presentes e a reacção ocorreu durante a noite. A purificação dos lipossomas fez-se com ultracentrifugação (300 000 x g, 2h a 15 °C). De seguida, procedeu-se à sua caracterização, com base no seu tamanho e carga tabela 17.

Tabela 17: Valores de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial ζ dos lipossomas antes e após a conjugação com antagonista G

Lipossomas	DH (μm)	PDI	ζ (mV)
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀	0,14	0,081	-1,5
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -mal (antes da reacção)	0,14	0,074	-0,5
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -antG (método directo)	0,15	0,093	-0,8

Os valores do potencial ζ são modas de um conjunto de 100 medições (são registados os valores mais estáveis após uma corrida de 100 medições da amostra). EPC: fosfatidil colina da lecitina de ovo, Chol: colesterol, DSPE-PEG₂₀₀₀: 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-poli(etilenoglicol)2000 (mal: maleimida, antG: antagonista G)

Não se observaram alterações de tamanho ou carga dos lipossomas após a ligação do péptido, o que está de acordo com as previsões, uma vez que é uma molécula pequena e sem carga.

3.2.2. Método de pós-inserção

No caso da inserção de DSPE-PEG₂₀₀₀-antagonista G em lipossomas, a conjugação do péptido ocorreu em micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida, as quais foram adicionadas posteriormente aos lipossomas formados.

Os lipossomas preparados para este método tinham a mesma formulação dos lipossomas do método directo, com a excepção de não conter DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida. A quantidade correspondente à razão molar deste lípido na formulação original foi usada para preparar micelas. A hidratação do filme de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida foi feita de modo a que a sua concentração final fosse superior à concentração micelar crítica (0,5 mM). Após a formação de micelas de DSPE-PEG-maleimida, o antagonista G activado foi adicionado à suspensão na razão molar 1,4:1 (péptido:maleimida) e a reacção de conjugação ocorreu durante a noite.

Uma vez que a formulação usada neste trabalho, é uma mistura EPC:Chol, a sua temperatura de transição de fase é bastante baixa (abaixo de 0 °C), pelo que à temperatura ambiente, a bicamada lipossomal se encontra na fase fluida-ordenada. As

características fluidas da membrana lipossomal favorecem o processo termodinâmico de inserção de fosfolípidos como DSPE, sem necessidade de fornecer energia externa sob a forma de calor. Por esta razão, as micelas após a conjugação, foram adicionadas à suspensão lipossomal em condições bastante moderadas (temperatura ambiente com ligeira agitação) e o processo de inserção ocorreu durante 1 h.

Após a remoção de todos os reagentes por ultracentrifugação a 300 000 x g durante 2 h a 15 °C, os lipossomas obtidos foram caracterizados quanto ao tamanho e carga (tabela 18).

Tabela 18: Valores de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial ζ dos lipossomas antes e após a conjugação com antagonista G e após a inserção de DSPE-PEG-antagonista G

Lipossomas	D _H (μm)	PDI	ζ (mV)
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀	0,14	0,081	-1,5
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -mal (antes da reacção)	0,14	0,074	-0,5
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -antG (método directo)	0,15	0,093	-0,8
EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -antG (método pós-inserção)	0,14	0,060	-1,4

Os valores do potencial ζ são modas de um conjunto de 100 medições (são registados os valores mais estáveis após uma corrida de 100 medições da amostra). EPC: fosfatidil colina da lecitina de ovo, Chol: colesterol, DSPE-PEG₂₀₀₀: 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-poliétilenoglicol2000 (mal: maleimida, antG: antagonista G)

Tal como foi esperado, não se observaram diferenças entre os diferentes tipos de lipossomas preparados, tanto usando o método directo, como usando o método de pós-inserção. Foi possível obter populações lipossomais quase monodispersas, com tamanhos na ordem de 0,14 μm, em concordância com os lipossomas de longo tempo de circulação não direccionados. Também a carga se manteve neutra após o acoplamento e após a inserção, o que indica que não houve interferências do péptido nas membranas lipossomais e as características físico-químicas dos lipossomas se mantiveram constantes.

3.3. Doseamento do antagonista G e rendimento da ligação

O doseamento do péptido foi feito por espectroscopia de fluorescência, com o recurso à curva padrão efectuada com o péptido livre na presença de lípidos. As soluções padrão de péptido (não activado) usadas na curva de calibração foram preparadas

contendo a mesma concentração e composição lipídica que os lipossomas da reacção. Os lipossomas em ambos os casos foram lisados com metanol a 90 % (v/v) e foi medida a intensidade de fluorescência das amostras com excitação a 288 nm e emissão a 330 nm.

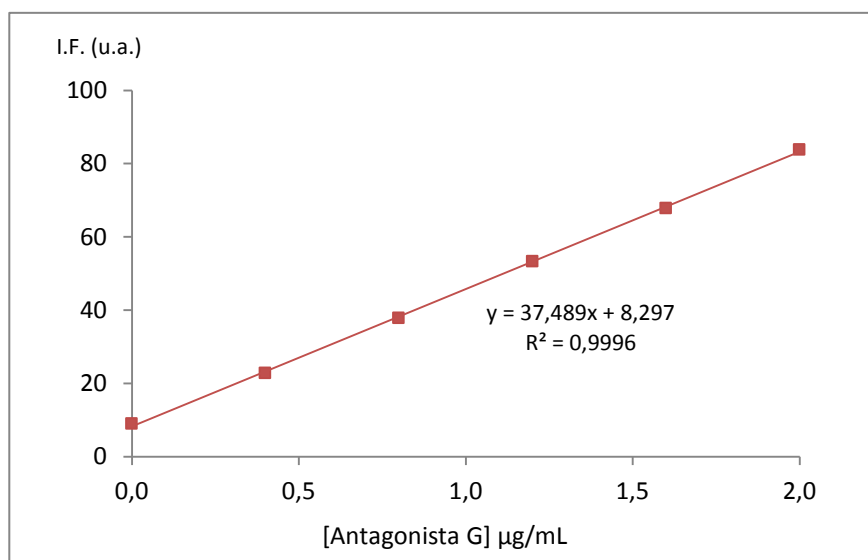


Figura 38: Curva de calibração tipo para o doseamento do antagonista G por espectroscopia de fluorescência, após a ligação aos lipossomas

Tabela 19: Valores de percentagem molar do antagonista G (AntG) em relação ao lípido total de lipossomas após a sua ligação aos lipossomas pelo método de pós-inserção e acoplamento directo

	Método de pós-inserção	Método de acoplamento directo
[AntG] mM	0,03	0,05
[Lípido] mM	9,8	10,6
AntG/Lípido (% mol)	0,29	0,50
AntG/maleimida (% mol)	41,4	71,4

Os valores apresentados são médias das medições efectuadas em triplicado a partir de um ensaio de ligação do péptido aos lipossomas

Como se pode observar na Tabela 19, a quantidade de antagonista G ligado aos lipossomas pelo método directo foi sensivelmente igual à quantidade obtida pelo método de pós-inserção (ligeiramente superior no primeiro caso). A eficiência de ligação do péptido pelos dois métodos testados foi perto de 60 % mol péptido/maleimida. Este valor está em concordância com os valores obtidos em estudos anteriores por Carvalho, M.C.,⁹⁴ onde foram obtidos valores na ordem de 67 % mol péptido/meleimida. Por esta razão efectuou-se apenas uma experiência de ligação

deste péptido, prosseguindo-se para os estudos de internalização em células (ver secção seguinte).

Admitindo que a eficácia de ligação covalente é mesma em ambos os casos, no caso do método de pós-inserção, também é preciso ter em conta a eficiência de inserção do lípido conjugado na bicamada lipídica. O processo de inserção, ainda que favorecido termodinamicamente à temperatura utilizada na experiência, é um equilíbrio entre o lípido inserido na bicada e na sua forma de micelas, pelo que a sua eficácia não é de 100 %. O resultado de 0,3 % de antagonista G em relação à quantidade total de lípido indica que cerca de 40 % da quantidade total de DSPE-PEG-maleimida reagiram e foram inseridos na bicamada lipossomal (DSPE-PEG-maleimida usado correspondeu a 0,7 % do lípido total de lipossomas). Este valor está em concordância com os estudos efectuados por Moreira e colegas, que usaram o mesmo péptido em lipossomas diferentes (lipossomas catiónicos para entrega de oligonucleótidos a células tumorais).⁹⁵

O método de ligação directa também originou quantidades de péptido elevadas presentes em lipossomas. Atendendo a que nem todos os grupos maleimida adicionados à mistura inicial de lípidos estão orientados para o exterior dos lipossomas pode-se afirmar que a eficiência da conjugação foi elevada.

Em ambos os casos, a quantidade de antagonista G detectado em lipossomas foi superior à quantidade de ácido fólico. Os maiores rendimentos de ligação do péptido podem ser explicados pelo fato de este ser solúvel em solventes aquosos e a sua activação ser mais eficiente. Com os resultados globais obtidos através da preparação de lipossomas direccionais com estes dois ligandos é possível sistematizar os factores mais importantes na conjugação. Em primeiro lugar, a solubilidade do composto a conjugar é o factor mais importante neste processo, facto que pode ser determinante na sua escolha. Para além disso, a quantidade e complexidade de passos que levam à activação química do composto previamente à sua ligação aos lipossomas têm de ser minimizados ao máximo. Como a activação do antagonista G deu-se em apenas um passo e em tampão, o rendimento final da reacção foi superior ao rendimento obtido para o ácido fólico. Por último, o método de ligação do ligando aos lipossomas também tem um papel crucial na conjugação. Neste trabalho foram testados dois métodos, o

que permitiu pôr em evidência algumas das vantagens da ligação directa em relação ao método de pós-inserção. Portanto, é da maior importância uma continuação do trabalho com o AF no sentido de aperfeiçoar a metodologia da sua ligação directa a lipossomas.

4. Internalização de Lipossomas em Células Tumorais

Após a preparação de lipossomas direccionados, a sua internalização em células foi avaliada qualitativamente, usando microscopia de fluorescência. Lipossomas marcados com rodamina (usando um lípido conjugado covalentemente com rodamina, PE-Rhod) foram visualizados em células tumorais imortalizadas e a sua internalização foi avaliada.

Foram testadas 3 formulações lipossomais (ver Figura 12) e as internalizações foram comparadas com os resultados obtidos, usando lipossomas de longa circulação não direccionados.

No caso de lipossomas direccionados com ácido fólico, os ensaios *in vitro* foram feitos em duas linhas celulares humanas com células aderentes, células epiteliais de cancro cervical que sobreexpressam receptores de folato (HeLa) e células epiteliais do cancro da mama, onde a expressão deste receptor é baixa (MCF7)^{96,97} (Figura 39 a e b respectivamente).

Os lipossomas direccionados com antagonista G foram testados em células H69, uma linha celular usada como modelo de SCLC⁹⁵ (Figura 39 c), linha celular com células em suspensão.

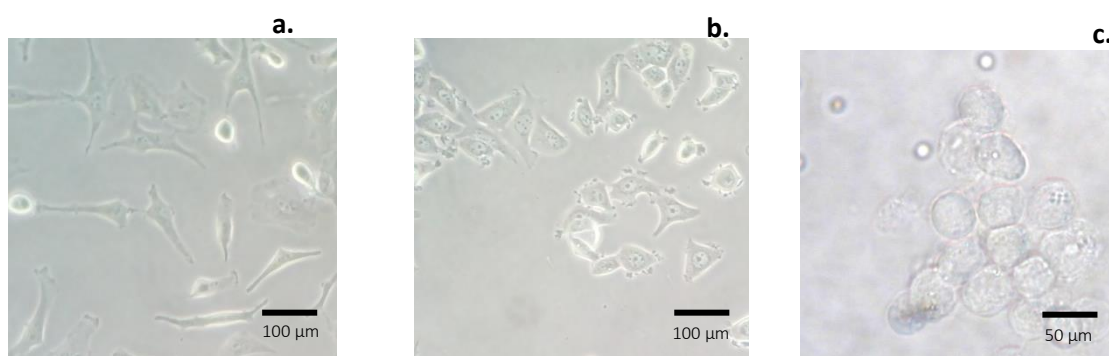


Figura 39: Fotografias de células HeLa (a.), MCF7 (b.) e H69 (c.) visualizadas ao microscópio óptico com a ampliação de 400 x

4.1. Estudo da expressão do receptor de folato (FR α) em células

HeLa e MCF7

Apesar de se encontrar frequentemente referido na literatura que as células HeLa sobreexpressam receptores de folato, ao contrário das células MCF7, estas linhas celulares podem sofrer alterações epigenéticas ou até mutações ao longo da sua manutenção (a linha celular HeLa é utilizada em laboratórios desde 1951), que podem levar a diferenças de expressão de proteínas.

De modo a confirmar o fenótipo celular em relação ao receptor de folato (FR α), a sua expressão foi avaliada com o recurso ao método de PCR de transcriptase reverso (RT-PCR), a partir do mRNA total extraído das células. Para tal, foram desenhados dois *primers* que possibilitem a amplificação específica de uma certa região da sequência do mRNA desta proteína.

O gene que codifica para FR α em humanos está localizado no cromossoma 11 (11q3). O processamento do pré-mRNA transcrito deste gene resulta em pelo menos 7 mRNAs diferentes, devido ao *splicing* alternativo (4 dos quais estão representados esquematicamente na Figura 40). As sequências de mRNA desta proteína foram obtidas no NCBI Gene Bank (gene ID: 2348) e o seu alinhamento, efectuado com a ferramenta *Clustal Omega* (EMBL-EBI).

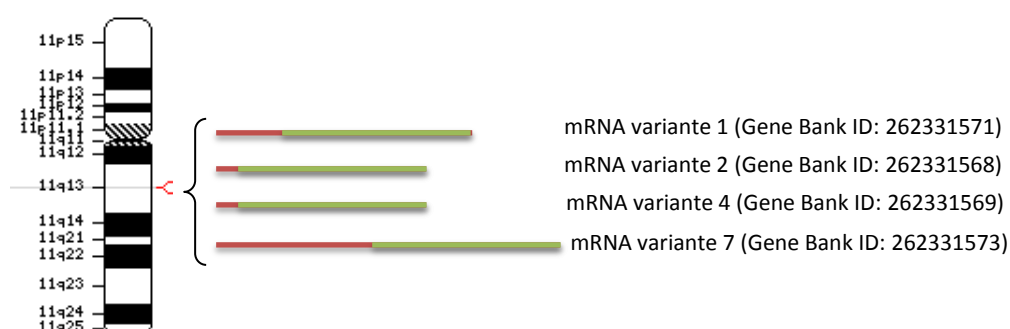


Figura 40: Esquema de localização do gene FOLR1 no cromossoma humano 11, com 4 diferentes produtos de mRNA (a verde estão representadas as regiões de homologia de sequência).

Os *primers* foram escolhidos na região homóloga a todas as sequências de mRNA amplificando um fragmento de 306 pares de bases.

O método de RT-PCR passou pela extração do RNA total das células estudadas, com a ajuda do *kit* de extração de RNA (ver materiais e métodos). Após este processo, procedeu-se à electroforese do produto de modo a avaliar a integridade e pureza do mesmo. O resultado encontra-se apresentado na Figura 41.

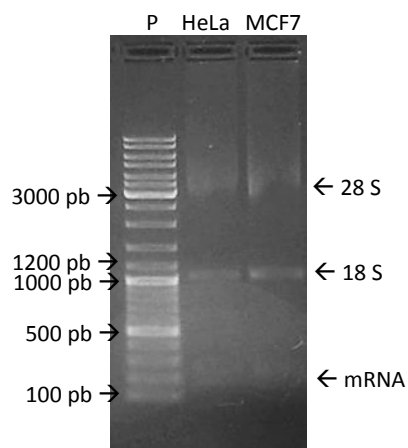


Figura 41: Fotografia do gel de agarose após a electroforese de RNA total extraído de células HeLa e MCF7 (P – mistura de padrões de DNA) As setas indicam as bandas correspondentes a RNA ribossomal 28 S, 18 S e RNA mensageiro (mRNA)

As bandas de RNA com tamanhos próximos de 3000 pares de bases e entre 1200 e 1000 pares de bases correspondem ao RNA ribossomal respectivamente de subunidades 28S e 18S. A presença destas bandas sugere que a integridade do RNA total não foi comprometida durante a extração. O arrastamento da banda de 28S pode indicar uma possível contaminação com DNA. As bandas de maior migração e bastante difusas indicam a presença de mRNA. Uma vez que tanto a região de amplificação entre os *primers* de GAPDH como entre os *primers* de FR α contêm intrões nas respectivas sequências de DNA, a presença de DNA contaminante não constitui um problema.

O RNA extraído foi utilizado para sintetizar DNA complementar (cDNA), usando *primers* aleatórios e transcriptase reversa (Revertaid H minus), a partir do qual se fez a amplificação específica da região de sequência escolhida do receptor de folato, com os *primers* desenhados. Como controlo da integridade de RNA e, conseqüentemente, de cDNA formado, foram utilizados *primers* de uma proteína constitutivamente expressa em todas as células, 3-fosfato de gliceraldeído desidrogenase (GAPDH). Os *primers*

usados para este enzima da via glicolítica amplificam uma região de 496 pb. A Figura 42 apresenta os resultados de PCR usando os primers específicos para FR α e primers para GAPDH.

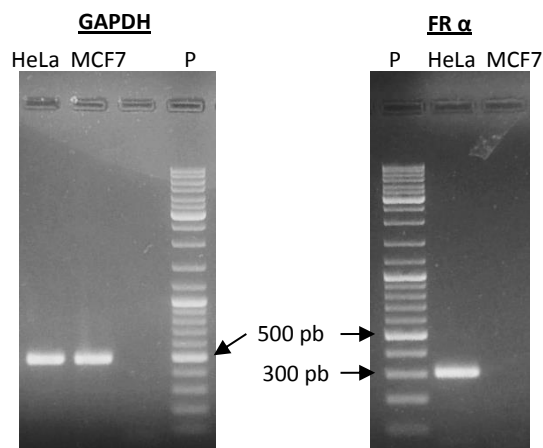


Figura 42: Fotografia dos géis de agarose após a electroforese dos produtos de PCR, usando primers de 3-fosfato de gliceraldeído desidrogenase (GAPDH) e primers de receptores de folato α (FR α) em células HeLa e MCF7

Na Figura 42, relativa a PCR com *primers* de GAPDH, é possível observar duas bandas intensas de tamanho aproximado de 500 pares de bases (terceira banda mais intensa dos padrões de DNA aplicados). O tamanho da região de amplificação compreendida entre os *primers* deste enzima é precisamente 496 pares de bases, pelo que a banda observada é o resultado de amplificação do cDNA das duas linhas celulares. Uma vez que os *primers* de GAPDH foram desenhados de modo a amplificar uma região de mRNA que contém um intrão na respectiva sequência de DNA e apenas foi observada uma banda após o PCR, é possível afirmar que o cDNA das amostras não está contaminado com DNA.

Com o uso de *primers* para FR α , observou-se uma banda com o tamanho aproximado de 300 pares de bases apenas na pista relativa ao produto de PCR de cDNA das células HeLa. O tamanho da região de amplificação compreendida entre os *primers* desenhados para esta proteína é de 306 pares de bases, o que permite concluir que a única banda observada é o resultado da amplificação desta região.

Com esta experiência confirmou-se a expressão de receptor de folato, FR α , apenas em células HeLa, tal como esperado.

4.2. Otimização da internalização de lipossomas direccionados com ácido fólico

No estudo de internalização de lipossomas pelas células tumorais, os processos da sua preparação e ligação covalente dos ligandos foram idênticos aos processos otimizados anteriormente, com a excepção de se acrescentar, fosfatidiletanolamina de ovo marcada com rodamina na formulação lipídica. As razões molares dos lípidos em lipossomas não direccionados e direccionados foram, respectivamente, EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:PE-Rhod (68,25:30,5:1,25:0,07) e EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-mal:PE-Rhod (68,25:30,5:0,55:0,7:0,07). Uma vez que a presença de rodamina na formulação lipossomal apresenta uma elevada interferência na intensidade de fluorescência tanto do AF como do antagonista G, admitiu-se que a quantidade de ligando à superfície desses lipossomas é igual à quantidade obtida em lipossomas sem rodamina. Isto é, assumiu-se que este composto fluorescente não interfere na ligação. No caso dos lipossomas direccionados com AF a razão molar usada para a ligação foi de 1:10 (AF:maleimida). Como controlo negativo foram usados lipossomas não direccionados e como controlo positivo, utilizaram-se lipossomas contendo DPSE-PEG-AF comercial, com a mesma quantidade que foi obtida após a ligação do AF ao DSPE-PEG-maleimida. Após a ligação os valores de AF detectados em lipossomas foram na ordem de 0,1 % (mol AF/lípido total). Tendo isto em conta e admitindo que cerca de metade das moléculas de fosfolípidos funcionalizados ficam orientadas para o exterior dos lipossomas após a sua formação, DSPE-PEG₂₀₀₀-AF foi adicionado na proporção de 0,2 % mol em relação aos lípidos totais. Os lipossomas foram caracterizados quanto ao tamanho e carga previamente à sua utilização em células (Tabela 20).

Tabela 20: Valor de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial ζ dos lipossomas preparados para os ensaios de internalização *in vitro*. Lipossomas-AF (sintetizado): lipossomas direccionados com ácido fólico acoplado *a posteriori*, Lipossomas-AF (comercial): lipossomas direccionados com ácido fólico por meio do lípido funcionalizado com esta molécula adquirido previamente.

Lipossomas	DH (μ m)	PDI	ζ (mV)
Não direccionados	0,14	0,055	-1,6
Lipossomas-AF (sintetizado)	0,14	0,077	0,1
Lipossomas-AF (comercial)	0,14	0,081	-1,0

Previamente aos ensaios com lipossomas, a densidade celular óptima para a visualização ao microscópio, foi otimizada. As células HeLa foram adicionadas a uma placa de 24 poços nas densidades de 1 a 6×10^4 células/poço e incubadas durante 24 h na estufa a 37°C e a 5 % de CO_2 , para aderir ao fundo do poço. No dia seguinte, os poços foram observados ao microscópio óptico. As densidades apropriadas escolhidas para o ensaio foram entre 4 a 5×10^4 células/poço. A densidade de 5×10^4 células/poço foi escolhida para os estudos posteriores.

As células HeLa foram aderidas a lamelas de vidro em meio DMEM completo. Numa primeira abordagem, a incubação com lipossomas foi feita em meio DMEM durante 1 e 3 h, com concentrações lipídicas de 10, 100 e 500 μM . Após a incubação as células foram lavadas com PBS, fixadas com PFA 2 % (m/V) e os seus núcleos foram corados com DAPI. Os resultados estão apresentados nas figuras Figura 43 e Figura 44.

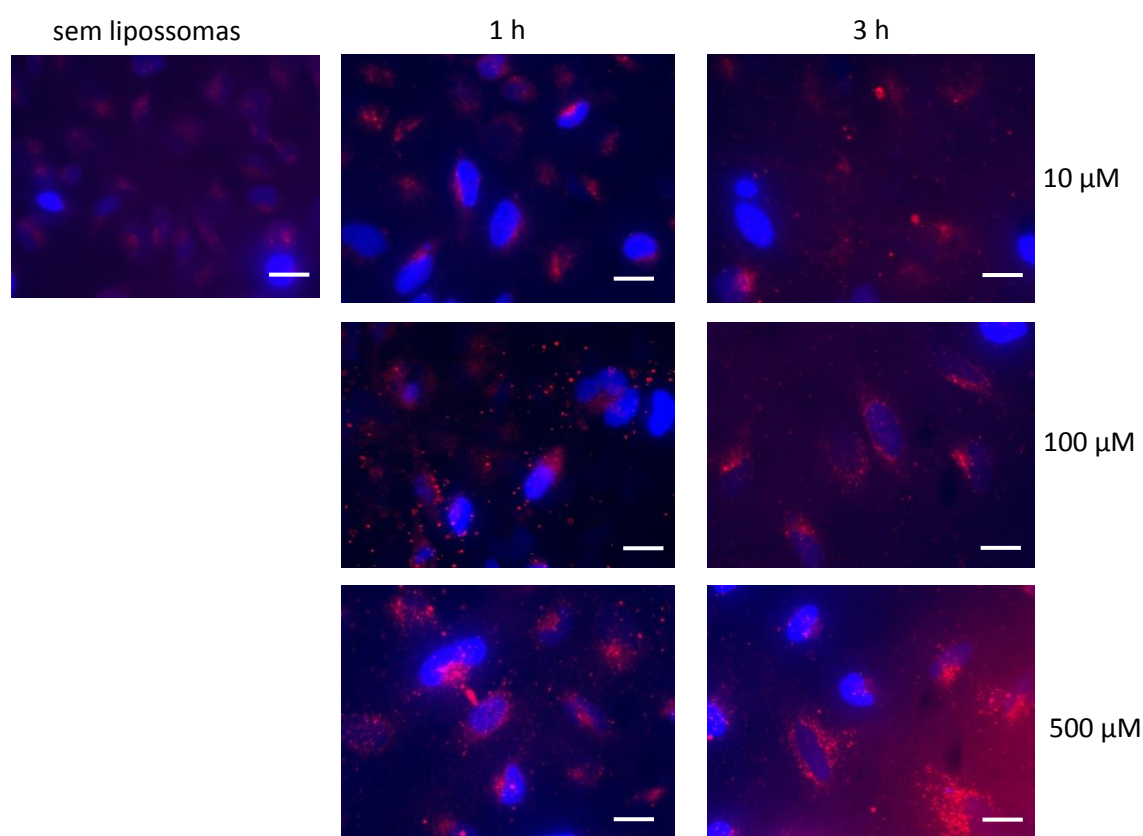


Figura 43: Imagens de microscopia de fluorescência de células HeLa fixadas e coradas com DAPI (azul) após 1 e 3 horas de incubação com diferentes concentrações de lipossomas não direccionados (10-500 μM), contendo fosfatidil etanolamina marcada com rodamina (PE-Rhod) (vermelho). Imagens tiradas separadamente com filtros de DAPI e Rodamina, posteriormente sobrepostas, usando o software ImageJ®. Barras brancas – 50 μm

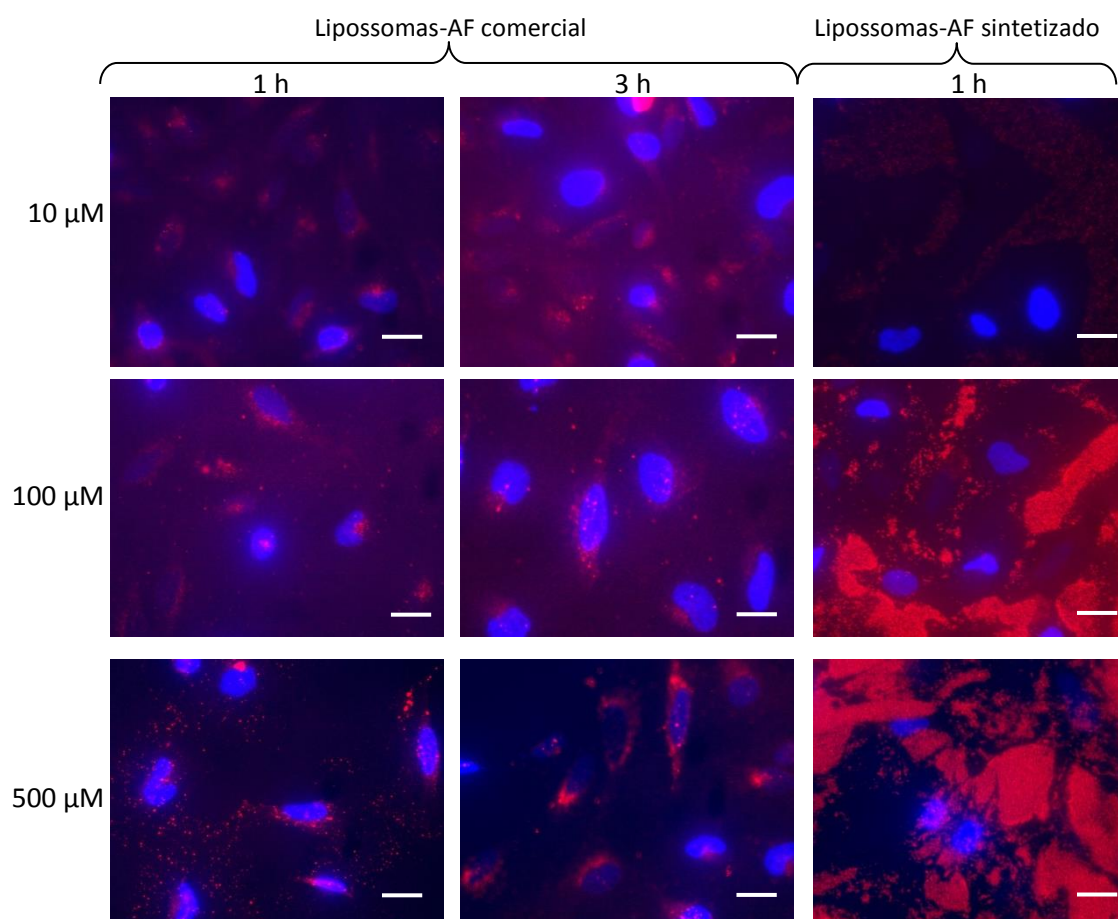


Figura 44: Imagens de microscopia de fluorescência de células HeLa fixadas e coradas com DAPI (azul) após 1 e 3 horas de incubação com diferentes diluições de lipossomas direccionados com AF, contendo fosfatidil etanolamina marcada com rodamina (PE-Rhod) (vermelho). Imagens tiradas separadamente com filtros de DAPI e Rodamina, posteriormente sobrepostas, usando o software ImageJ®. Barras brancas – 50 μ m

Analisando as Figura 43 e Figura 44, é possível observar internalização de lipossomas direccionados e não direccionados com AF após 1 e 3 h de incubação. As células adquirem marcação vermelha à volta do núcleo que se deve à endocitose de lipossomas, que é mais pronunciada após 3 h de incubação. É possível observar uma marcação relativamente mais forte das células com rodamina usando lipossomas direccionados com DPSE-PEG-AF comercial, em relação aos lipossomas brancos. No entanto as diferenças observadas não são muito evidentes. Para concentrações de 500 μ M a análise da internalização torna-se mais fácil, sendo possível observar diferenças com maior clareza. Devido a esta observação, a concentração lipídica escolhida para ensaios futuros foi de 500 μ M.

No que diz respeito aos lipossomas após a reacção com AF activado, não foi possível visualizar internalização, uma vez que as preparações apresentavam quantidades

consideráveis de partículas fluorescentes inespecificamente distribuídas em toda a extensão da lamela. Uma explicação possível para esta observação é a qualidade de lavagem das lâminas após a incubação. No entanto, como as lamelas relativas a incubações com os lipossomas não direccionados e com PEG-AF comercial foram tratadas da mesma forma e não apresentaram este aspecto, é provável que o problema se deva à qualidade dos lipossomas. Possíveis contaminantes à superfície dos lipossomas após a reacção podem causar a sua precipitação e marcação forte da lamela.

Após esta primeira abordagem, surgiram dois problemas relevantes: dificuldade de observação da internalização de lipossomas após a reacção com AF e dificuldade de distinção da marcação de células entre lipossomas direccionados e não direccionados. No sentido de corrigir o problema da marcação forte e inespecífica das lamelas, os lipossomas após a reacção foram purificados por duas técnicas consecutivas: ultracentrifugação (300 000 x g durante 2 h a 15 °C), seguida da cromatografia de exclusão molecular (com coluna Econo-Pag® 10 DG).

O problema da baixa diferença dos níveis de marcação celular com lipossomas direccionados em relação aos não direccionados pode ter a origem no tipo de meio de cultura usado durante a internalização. Neste caso, usou-se o meio DMEM completo, um meio bastante comum em ensaios com células imortalizadas. O problema desta abordagem está no facto de esta solução ser suplementada com AF no seu fabrico. Segundo o fabricante, a concentração desta vitamina neste meio é de 9 µM. Esta é uma concentração demasiado elevada para fazer ensaios de internalização mediada especificamente por receptores de folato, uma vez que estes se encontram completamente saturados nestas condições ($K_d^{FR} < 1nM$). De facto, em estudos com partículas direccionadas com AF os meios onde os ensaios são realizados são completamente desprovidos desta vitamina, ou contêm uma concentração bastante inferior à encontrada do DMEM comum. Uma vez que a aquisição deste tipo específico de meios requer gastos consideráveis de tempo e dinheiro, e pelo facto de *in vivo* os fluidos biológicos que envolvem as células tumorais conterem sempre AF, optou-se por usar um meio alternativo com menor teor em folatos. Para tal recorreu-se ao meio RPMI, que na sua composição, segundo o fabricante, contem 4 vezes menos AF do que

o DMEM (2,3 μM). Ainda assim, esta concentração excede a constante de dissociação de receptores de folato em cerca de 2 ordens de grandeza, pelo que apesar de ser uma escolha melhor que DMEM, este não é o melhor meio para realizar este tipo de estudos.

Após esta primeira abordagem as condições escolhidas para os ensaios foram as seguintes:

- Dois passos sequenciais de purificação de lipossomas após a ligação com AF (ultracentrifugação e cromatografia de exclusão molecular);
- Concentração lipídica ideal de trabalho (500 μM)
- Meio de incubação com lipossomas (células mantidas e aderidas as lamelas em DMEM e ensaios de internalização feitos em RPMI)

Com as condições estabelecidas, procedeu-se ao estudo da internalização dos 3 tipos de lipossomas, desta vez em células HeLa e MCF7 (com a mesma densidade celular).

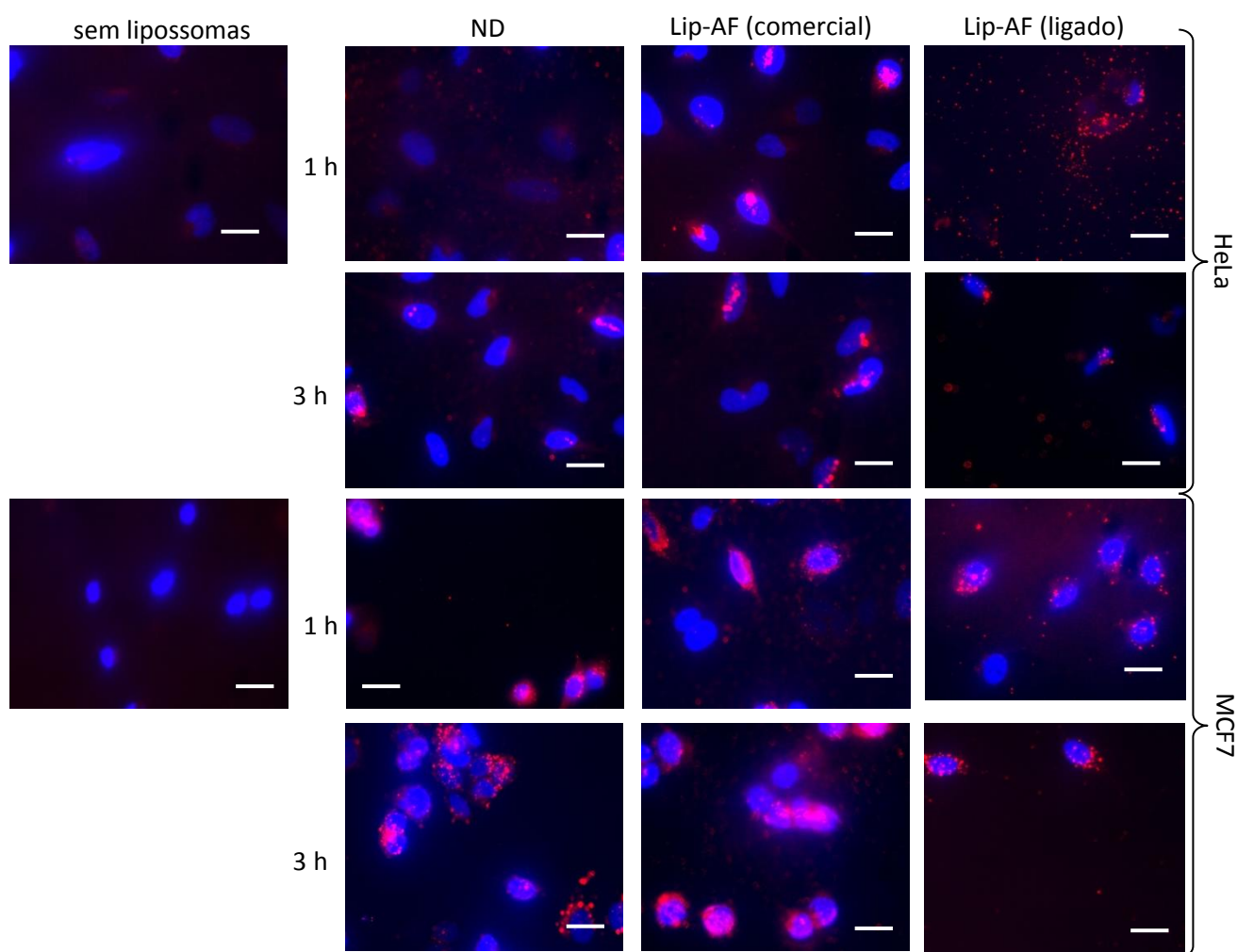


Figura 45: Imagens de microscopia de fluorescência de células HeLa e MCF7 fixadas e coradas com DAPI após 1 e 3 horas de incubação com lipossomas não direccionados (ND), direccionados com 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-polietilenoglicol2000-ácido fólico (DSPE-PEG-AF comercial, Lip-AF comercial) e direccionados após a ligação do AF (Lip-AF ligado) na concentração lipídica de 500 μM . Imagens tiradas separadamente com filtros de DAPI e Rodamina, posteriormente sobrepostas, usando software ImageJ®. Barra branca – 50 μm

As imagens de fluorescência da Figura 45 demonstram uma elevada internalização dos lipossomas direccionados com DSPE-PEG-AF comercial, em relação aos lipossomas não direccionados testados em células HeLa. As diferenças de fluorescência das células incubadas com estes dois tipos de lipossomas são mais evidentes, no caso de se usar RPMI como meio onde se testou a internalização. Uma particularidade observada neste ensaio foi a localização intracelular das partículas endocitadas. Nas imagens das células HeLa com lipossomas Lip-AF (comercial) após 1 e 3 h de incubação, é possível observar uma marcação vermelha ao nível dos núcleos, em zonas bem definidas das células. A Figura 46 (b) evidencia esta observação.

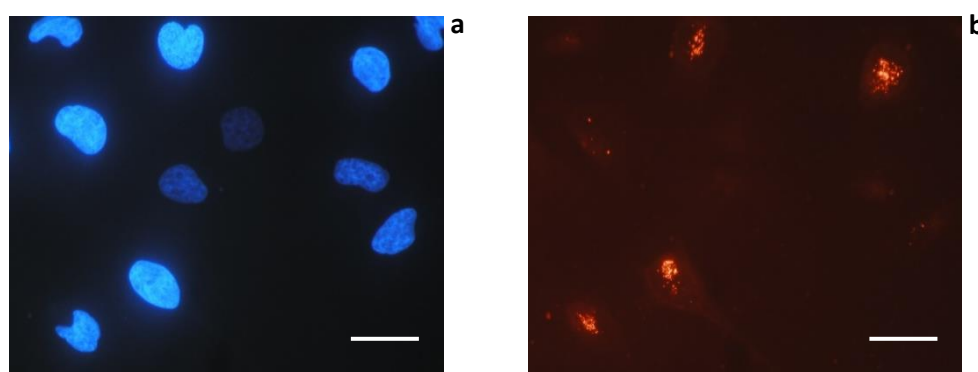


Figura 46: Imagens de microscopia de fluorescência de células HeLa fixadas e coradas com DAPI após 1 hora de incubação com lipossomas direccionados com 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-polietilenoglicol2000-ácido fólico (DSPE-PEG-AF comercial) na concentração lipídica de 500 μ M. À esquerda estão representados os núcleos corados com DAPI (a), os lipossomas marcados com Rodamina (b). Barras brancas – 50 μ m

O destino das vesículas endocíticas formadas por meio de receptores de folato são os lisossomas com a posterior reciclagem dos receptores de volta para a membrana plasmática. Por essa razão, a localização subcelular do ácido fólico internalizado por este mecanismo é cingida ao citoplasma. As imagens observadas com a localização nuclear de partículas marcadas podem ser explicadas de duas formas: em primeiro lugar, é possível que esta marcação seja devida a lipossomas ligados à membrana plasmática localizados nessa zona e por outro lado, estes podem ser internalizados e estarem sobrepostos com o núcleo no interior celular. A técnica de microscopia confocal poderia ser usada para resolver este problema. Esta permite localizar com maior precisão a localização intracelular destas partículas. No entanto, não foi possível visualizar imagens com o microscópio confocal devido a problemas técnicos, pelo que esta abordagem tem de ser explorada num trabalho futuro.

Como se pode observar na Figura 45, os lipossomas com ácido fólico ligado não deram origem à marcação forte e inespecífica da lamela, como foi observado anteriormente (Figura 44), pelo que a ultracentrifugação seguida da cromatografia eliminaram a maior parte das impurezas. Em células HeLa após 1 hora de incubação com este tipo de lipossomas foi possível visualizar uma marcação à volta dos núcleos, ainda que menos forte e com maiores quantidades de partículas no espaço extracelular em relação aos lipossomas Lip-AF comercial. A marcação de células após uma hora de incubação com Lip-AF ligado foi maior em relação aos lipossomas não direccionados. No entanto, após 3 h de incubação não se observaram diferenças claras. Uma vez que os lipossomas não direccionados também são internalizados por endocitose (não mediada por receptores de folato), ao fim de 3 h os níveis de partículas endocitadas são próximos. Na literatura, é possível encontrar diversas estratégias para o estudo de internalização de lipossomas e outras nanopartículas numa cultura celular, com tempos de incubação com estas partículas que podem variar desde 1h até 48 h.^{53,74,98} Com outros exemplos, Polloc e colegas demonstraram recentemente que lipossomas, cuja formulação é semelhante à composição da membrana do retículo endoplasmático, são internalizados e levados para este organelo em cerca de 30 min por endocitose mediada por diferentes receptores.⁹⁹ No que diz respeito aos lipossomas direccionados com ácido fólico, os tempos de incubação mais frequentemente encontrados na literatura são à volta de 1 h.^{46,96} Neste último estudo, Chen e colegas demonstraram uma elevada internalização de lipossomas direccionados com ácido fólico após 1h de incubação, atingindo um máximo após 4h de incubação de células HeLa com estas partículas (comparativamente à incubação com células MCF7). Um estudo cinético efectuado por Paulos e colegas demonstrou uma rápida ligação de AF marcado à superfície de células HeLa (entre outras linhas testadas) após 30 minutos de incubação, seguindo-se de um *plateau* nos níveis de ácido fólico à superfície destas células. Adicionalmente neste estudo, também foram calculados tempos de reciclagem deste receptor em diferentes linhas celulares, obtendo-se valores na ordem de 6 a 20 h.¹⁰⁰ Por estas razões os tempos de incubação escolhidos no presente trabalho foram de 1 e 3 h. Para um maior detalhe do processo de internalização, seria necessário fazer um estudo cinético com mais tempos de incubação diferentes.

Para avaliar a endocitose não específica das partículas direccionadas com AF, realizou-se o ensaio de internalização em células MCF7, que, como foi averiguado por RT-PCR, não apresentam expressão do receptor de folato FR α . Como se pode observar na Figura 45, os processos endocíticos desta linha celular são bastante activos. Mesmo, usando lipossomas não direccionados, ao fim de uma hora observou-se uma marcação forte destas células com rodamina, não havendo diferenças entre os lipossomas direccionados com ácido fólico. Com esta linha celular, esperava-se uma internalização muito menos intensa em comparação com as células HeLa, devido à falta de receptores de folato na sua membrana plasmática. Os resultados obtidos não permitem confirmar a hipótese de direccionamento activo para células HeLa em relação às células MCF7, no entanto indicam que o direccionamento passivo para a segunda linha celular seria uma estratégia a considerar, devido a elevados níveis de endocitose de partículas de longa circulação não direccionadas.

Este estudo preliminar de endocitose de lipossomas preparados permitiu obter resultados satisfatórios de visualização de partículas não direccionadas e direccionadas com o lípido comercial conjugado com AF e com lipossomas modificados pelo processo descrito. Com isto, optimizaram-se as condições mais importantes de densidade celular, concentração de lípido durante a incubação e deu-se um passo importante na escolha do meio onde é feita a incubação. As condições de ensaio ainda não são ideais, devido à presença de elevadas quantidades de ácido fólico em solução para os lipossomas sintetizados. Note-se que ao diminuir o ácido fólico para concentrações nanomolares não se está a manipular as condições do meio de modo a obter resultados satisfatórios, fugindo às condições reais que se observam *in vivo*. Pelo contrário, as concentrações fisiológicas de ácido fólico em circulação sanguínea encontram-se entre 5 a 45 nM em adultos¹⁰¹ (<http://emedicine.medscape.com/article/2085523-overview>, 05/09/2014), o que justifica mais uma vez o potencial de direccionamento de partículas com esta molécula.

Apesar de ser possível observar internalização de partículas com lípido conjugado em laboratório, os resultados não são tão evidentes como no caso do lípido comercial. Apesar disso, com este trabalho deram-se passos iniciais e bastante importantes no sentido de desenvolvimento deste tipo de partículas. A sua preparação, purificação e

condições de internalização foram otimizados de modo a obter imagens de fluorescência com qualidade ideal para fazer estudos comparativos. O trabalho futuro tem de ser focado na optimização da ligação do ácido fólico aos lipossomas de modo a obter resultados iguais ou melhores aos lipossomas com o lípido comercial.

Como este é um estudo preliminar, para a sua validação é necessário prosseguir com estudos quantitativos de internalização. Para tal existem diferentes alternativas disponíveis: a citometria de fluxo é a opção mais precisa e reprodutível para fazer a quantificação de células positivas, apesar de não fornecer dados acerca da localização intracelular das partículas; por outro lado medidas de fluorescência de lisados celulares após a incubação com lipossomas permite quantificar a rodamina (lipossomas marcados) internalizada; também é possível recorrer à medição da quantidade de composto radioactivo internalizado, usando lípidos marcados com isótopos radioactivos, emitindo radiação beta (^3H , ^{14}C , etc..) ou gama (marcação do espaço interno aquoso dos lipossomas ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In)). A vantagem desta última marcação está no facto de não ser necessário de lisar as células para efectuar as medidas.

4.3. Internalização de lipossomas direccionados com antagonista G

A internalização de lipossomas direccionados com o péptido antagonista G (preparados por dois métodos diferentes: método de ligação directa do antagonista G e método de pós inserção) foi visualizada em células H69 e seguiu uma abordagem análoga à que foi optimizada para células HeLa e MCF7.

Uma vez que para esta linha celular, as células se encontram em suspensão e formam agregados, foi necessário recorrer a algumas modificações. A manutenção das células e os ensaios de internalização foram realizados em meio RPMI (presença de ácido fólico irrelevante para este caso). As células foram passadas suavemente e várias vezes por uma ponta de uma pipeta para desfazer os agregados. A densidade celular usada para o ensaio foi de 5×10^5 células/poço e a concentrações lipídica durante a incubação com lipossomas foi de 500 μM . As lavagens para remover o excesso de lipossomas com PBS

também foram feitas de forma diferente: ciclos de centrifugação (15 minutos a 153 x g) e ressuspensão em PBS. Estas células não foram fixadas nem coradas com DAPI, pelo que a sua visualização ao microscópio de fluorescência foi feita imediatamente após as lavagens com PBS. A dificuldade em obter imagens com relevância analítica deste tipo de células passa pelo facto de estas não aderirem à lamela, apresentando um volume considerável. Isto dificulta o uso de técnicas de microscopia na análise de processos intracelulares. Apesar destas desvantagens, foi possível obter imagens que permitiram uma comparação qualitativa de internalização dos diferentes tipos de lipossomas testados (Figura 47).

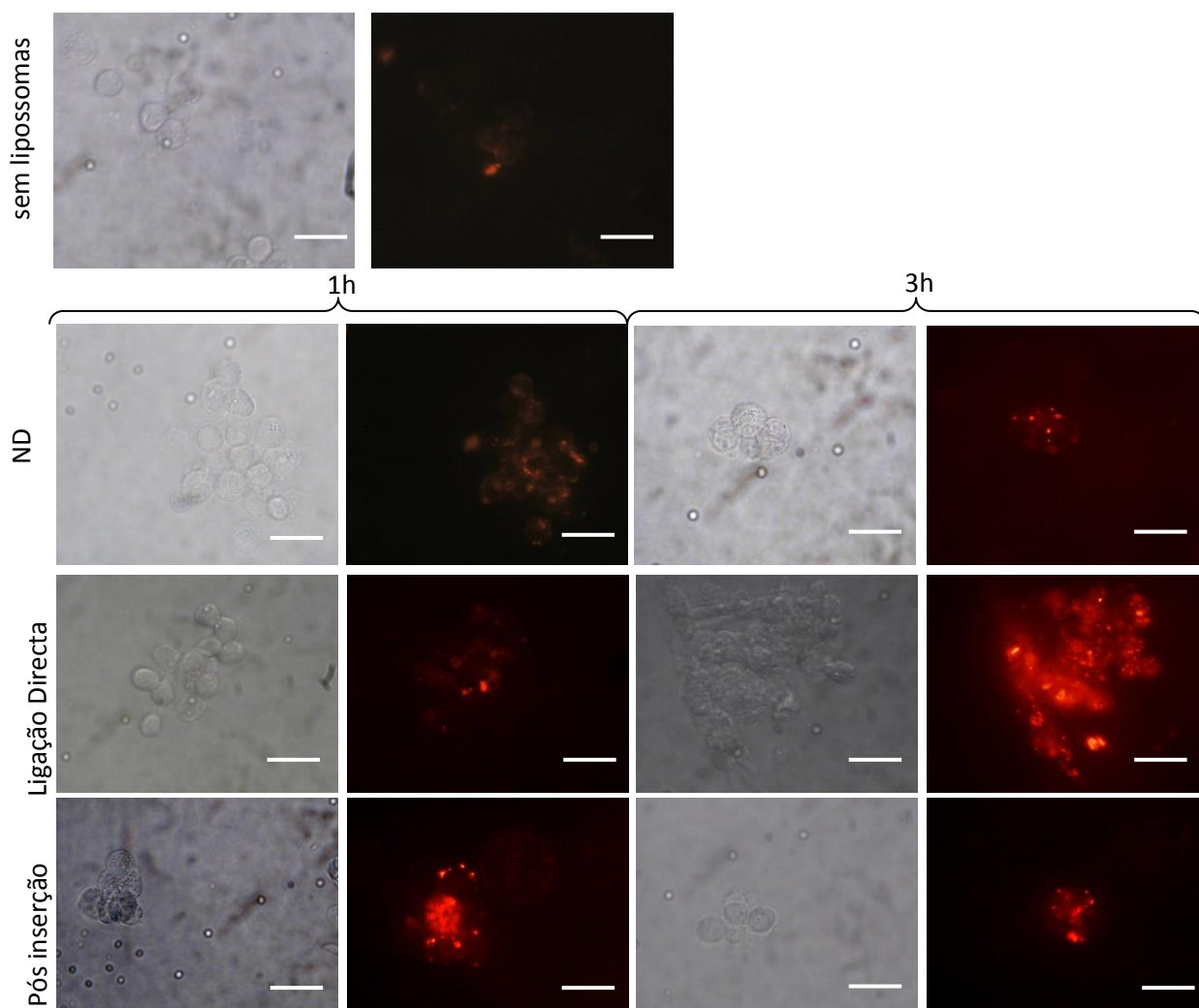


Figura 47: Imagens de microscopia de fluorescência e de campo claro de células H69 após 1 e 3 horas de incubação com lipossomas não direccionados (ND) e direccionados com antagonista G (preparados por dois métodos diferentes) na concentração lipídica de 500 μ M, marcados com fosfatidil etanolamina de ovo marcada com rodamina. Barras brancas – 50 μ m

Como se pode observar na Figura 47, obteve-se uma forte marcação das células com lipossomas direccionados preparados por dois métodos diferentes, sem se observar grandes diferenças entre os mesmos (ao fim de 1 h e 3 h de incubação). Ao fim de 1 h de incubação as diferenças entre os lipossomas não direccionados e direccionados já se tornam evidentes, observando-se menores níveis de marcação com rodamina das células incubadas com lipossomas não direccionados. Estes resultados estão em concordância com os estudos anteriores por Moreira e colegas, que detectaram níveis muito mais elevados de lipossomas direccionados com antagonista G em relação aos lipossomas não direccionados em células H69 ao fim de 1 h de incubação.⁴² A fluorescência das células incubadas com lipossomas não direccionados durante 1 h pode ser comparada facilmente com a autofluorescência das próprias células observada na preparação controlo (sem lipossomas). Isto indica uma rápida e forte internalização de lipossomas direccionados com antagonista G por meio dos respectivos receptores de neuropeptídeos sobreexpressos nesta linha celular. Por outro lado, ao fim de 3 h de incubação as células adquirem marcação com rodamina mesmo no caso de lipossomas não direccionados, o que indica para um processo de internalização não específica, tal como no caso das células HeLa e MCF7.

V. CONCLUSÕES

Conclusões

O tratamento de diferentes tipos de cancro (sobretudo tumores sólidos e metástases) tem sofrido alterações constantes nas últimas décadas, sobretudo, devido aos estudos cada vez mais intensivos que resultam no aparecimento de alternativas mais promissoras. A evolução da quimioterapia toma um rumo cada vez mais direccionado para tratamentos selectivos para as células tumorais, com o objectivo principal de evitar os efeitos citotóxicos do agente quimioterapêutico em tecidos saudáveis. As estratégias de selectividade mais estudadas passam por encapsular os compostos citotóxicos ou ácidos nucleicos em nanopartículas que permitem o seu transporte no organismo até ao local de libertação e acção.

Entre as partículas sólidas (*quantum dots* ou partículas de ouro), poliméricas ou lipídicas, os lipossomas ganham cada vez mais preferência entre os investigadores como veículos de transporte de agentes quimioterapêuticos no organismo. A sua evolução possibilitou o aparecimento de vesículas fosfolipídicas de longo tempo de circulação com características de elevada selectividade e afinidade para as células tumorais e não só. A existência de um marcador específico à superfície das células (malignas ou afectadas por uma doença) torna-as vulneráveis ao tratamento direccionado para o marcador em questão. Este facto torna os lipossomas atractivos não só para o tratamento de doenças oncológicas, mas também para o tratamento de outro tipo de patologias (doenças hepáticas, doenças inflamatórias ou infecciosas, etc.).

Precisamente esta versatilidade de modificação da superfície lipossomal, com o principal objectivo de criar um sistema especificamente direccionado para um certo tipo de células, foi explorada neste trabalho. Foi demonstrado que é possível modificar covalentemente com dois ligandos diferentes a superfície de lipossomas, usando a mesma química de ligação e sem interferir com a sua estrutura tridimensional. É de notar que esta abordagem é bastante vantajosa do ponto de vista da encapsulação do fármaco. A existência de um sistema fechado, contendo o agente terapêutico e grupos funcionais à superfície prontos para serem modificados, elimina as possíveis interacções entre o agente terapêutico encapsulado e a molécula de direccionamento.

Esta vantagem torna-se mais evidente no caso de compostos hidrófobos, incorporados na bicamada lipídica dos lipossomas. A ligação *a posteriori* de uma molécula de direccionamento implica a não destabilização da membrana, como por exemplo, usando o método de pós-insersão. Este método de ligação directa também é vantajoso em relação ao método convencional (inclusão do lípido previamente modificado na mistura lipídica inicial), na medida em que este último implica usar sensivelmente o dobro da quantidade teoricamente prevista de lípido modificado pois durante a formação e homogeneização dos lipossomas, metade fica orientada para o seu interior. Para além disso, o facto de ser possível preparar lipossomas com a mesma formulação e modificá-los à superfície com compostos diferentes abre horizontes no *teragnóstico* de inúmeras doenças, aliando métodos de diagnóstico aos métodos de tratamento.

Como foi discutido ao longo do trabalho, os rendimentos de ligação do ácido fólico e do péptido antagonista G aos lipossomas foram diferentes, com melhores resultados no último caso. Mais passos de activação do ácido fólico, a sua baixa solubilidade em água e a necessidade de misturar dois solventes diferentes na ligação aos lipossomas, contribuíram para um rendimento relativamente baixo. Note-se que, no caso do ácido fólico, trata-se de um processo de optimização da ligação que até à data não foi implementado em lipossomas formados, pelo que os obstáculos encontrados necessitam de mais tempo de exploração de estratégias diferentes para serem ultrapassados. Por outro lado, o péptido antagonista G, sendo uma molécula solúvel em solventes aquosos e mais lábil do ponto de vista da sua activação antes da ligação aos lipossomas, demonstrou melhores resultados quanto ao seu acoplamento aos mesmos. Para além disso, o método de pós-insersão usado na preparação destes lipossomas já foi optimizado e testado em células por outros grupos, como discutido anteriormente (método de pós-inserção), embora com formulações lipídicas e quantidades de reagentes diferentes. O método directo de ligação também foi testado recentemente por Carvalho, M.C.⁹⁴ Apesar das vantagens do ponto de vista físico-químico de usar péptidos no direccionamento, os custos associados à sua síntese e isolamento são muito mais elevados comparativamente a moléculas simples e comuns como o ácido fólico. É de notar também que, com uso de reagentes pouco dispendiosos e de fácil acesso (ácido fólico, NHS, DCC, cisteamina, etc.) foi possível preparar lipossomas

contendo um lípido funcionalizado, muito mais dispendioso. A síntese em laboratório deste tipo de lípidos a partir dos seus derivados (e.g. DPSE-PEG-maleimida) mais baratos é mais rentável em relação à aquisição do lípido funcionalizado.

Com os testes preliminares de internalização de lipossomas preparados em células tumorais, foi possível otimizar as condições dos ensaios para a visualização desta internalização no microscópio de fluorescência. A concentração lipossomal, densidade celular e tempos de incubação foram escolhidos de modo a obter imagens que permitam diferenciar níveis de marcação usando vários tipos de células e lipossomas. No presente trabalho, é difícil tirar conclusões acerca dos níveis de internalização, uma vez que apenas foram feitos ensaios qualitativos, embora seja possível observar diferenças entre lipossomas direccionados e não direccionados. De modo a confirmar estas observações, as imagens de microscopia deverão ser complementadas com estudos quantitativos. Apesar de não ter sido possível, no tempo útil da dissertação, realizar ensaios quantitativos, os resultados de internalização permitiram observar uma elevada marcação de células com lipossomas direccionados com ácido fólico (tanto com lipossomas contendo DSPE-PEG-AF comercial como sintetizado neste trabalho).

Foram observadas diferenças mais claras (em relação às células HeLa e MCF7) na internalização em células H69 entre os lipossomas não direccionados e lipossomas direccionados com antagonista G, preparados de duas formas diferentes. Estes resultados confirmam (indirectamente) a ocorrência de uma ligação covalente entre o péptido e os lipossomas, uma vez que uma simples adsorção levaria a internalização apenas do péptido, deixando os lipossomas no exterior. Desta forma, foi demonstrado que é possível acoplar covalentemente uma molécula à superfície de lipossomas sem comprometer a sua estrutura. Adicionalmente, a preparação deste tipo de lipossomas serviu como um ensaio de comparação em relação à ligação do ácido fólico. As conclusões a retirar da ligação do antagonista G pelo método directo ajudam na optimização da ligação desta vitamina. A redução de passos necessários à activação da molécula, o solvente onde ocorre a activação e a ligação aos lipossomas e a solubilidade são factores muito importantes a ter em conta na optimização deste processo.

CONCLUSÕES

Com o trabalho efectuado estabeleceu-se uma via a seguir nos estudos futuros. Foram criadas bases, com resultados preliminares promissores no sentido de desenvolver um veículo de entrega de fármacos a células tumorais especificamente dirigido pelo ácido fólico aos receptores de folato sobreexpressos em inúmeros tumores. Mais do que isso, o método optimizado pode ser aplicado na preparação de lipossomas dirigidos com qualquer tipo de molécula (como foi demonstrado no caso do péptido antagonista G) específica para um certo marcador da patologia em estudo.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

Perspectivas Futuras

Uma vez que o trabalho efectuado nesta dissertação partiu sem bases optimizadas (com a excepção da formulação lipídica a usar em lipossomas covalentemente modificados), o principal objectivo desta fase foi precisamente a tentativa da optimização do processo de preparação de lipossomas direccionados. Os resultados obtidos, para além de indicar os progressos conseguidos nesta área, indicam sobretudo o caminho a seguir nos trabalhos futuros.

Em concreto, o facto de se conseguir um baixo rendimento de ligação do ácido fólico aos lipossomas, também com baixo rendimento da sua activação indicam as possíveis falhas desta abordagem. Por exemplo, uso de um solvente diferente (mais volátil do que o DMSO) possibilitaria a sua remoção após a activação, diminuindo a interacção do mesmo com as membranas dos lipossomas. Adicionalmente, o processo de síntese de ácido fólico-SH usado neste trabalho (síntese de carbodiimidas) é bem conhecido na química orgânica, onde é bastante comum usarem-se catalisadores, como o DMAP (discutido na secção de Resultados e Discussão) ou o 1-hidroxibenzotriazole (HOBt), com o mesmo objectivo. Também a possibilidade de análise dos derivados de ácido fólico após as reacções de activação e ligação aos lipossomas por NMR poderia ser uma boa aproximação para controlar o processo e detectar a presença destes produtos.

No que diz respeito aos estudos de internalização celular, seria interessante montar o mesmo tipo de ensaios, com a excepção de se usar um meio de cultura desprovido (ou quantidades na ordem de nM) de folatos durante a incubação com lipossomas direccionados com esta vitamina. O facto de os meios usados nos ensaios não conterem o péptido antagonista G, possibilitou diferenciar melhor a internalização entre lipossomas direccionados e não direccionados. Como alternativa/complemento à microscopia de fluorescência, o uso de microscopia confocal é o próximo passo lógico a seguir na visualização da internalização. Adicionalmente poder-se-ia estudar a co-localização de lipossomas com organelos (usando anticorpos específicos para diferentes tipos de organelos) ou inibidores de diferentes passos da via endocítica para elucidar melhor o tráfego intracelular destas partículas.

Por fim, o aspecto mais importante no estudo de internalização de qualquer partícula é a sua quantificação em células alvo. Esta pode ser abordada com diferentes estratégias. A técnica mais robusta e fiável seria a citometria de fluxo (não se usou neste caso, devido a impedimentos técnicos do aparelho disponível). Como alternativa é possível usar lípidos com um marcador radioactivo na membrana lipossomas ou encapsular moléculas marcadas no seu interior hidrófilo e quantificar a sua internalização em células por contagem de radioisótopos por técnicas de cintilação. Uma terceira possibilidade de quantificação seria recorrer à espectroscopia de fluorescência, quantificando PE-Rhod em lisados celulares após a incubação com lipossomas.

Uma vez optimizado o processo de preparação de lipossomas, com bons rendimentos de ligação do ácido fólico, sem adsorção inespecífica à superfície de lipossomas e bons resultados de internalização, o passo seguinte é encapsular diferentes compostos, testando os parâmetros mais importantes e prosseguir para os estudos de biodistribuição *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Freire JM, Domingues, Matos, Melo, Veiga, Santos, Castanho, "Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes" *European Biophysics Journal* **40**(4), 481-487 (2011).
- ² Chen C, Ke, Zhou, Yi, Brunzelle, Li, Yong, Xu, Melcher, "Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors" *Nature* **500**(7463), 486-489 (2013).
- ³ Eeman M, Deleu, "From biological membranes to biomimetic model membranes" *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment (BASE)* **14**, 719-736 (2009).
- ⁴ Chang HH, Dea, "Insights into the dynamics of DMSO in phosphatidylcholine bilayers" *Biophysical Chemistry* **94**(1-2), 33-40 (2001).
- ⁵ Juzeniene A, Thu Tam, Iani, Moan, "The action spectrum for folic acid photodegradation in aqueous solutions" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **126**, 11-16 (2013).
- ⁶ M. E. M. Cruz, J. A. Almeida, and M. L. Corvo, "Sistemas De Libertação Controlada De Fármacos," in *Biotecnologia. Fundamentos e Aplicações*, edited by N. Lima and M. Mota (Lidel Edições Técnicas, Lisboa, 2003), pp.359-375.
- ⁷ Bangham AD, Glauert, Horne, Dingle, Lucy, "Action of Saponin on Biological Cell Membranes" *Nature* **196**(4858), 952-& (1962).
- ⁸ Rahman YE, Rosenthal, Cerny, Moretti, "Preparation and prolonged tissue retention of liposome-encapsulated chelating agents" *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **83**(4), 640-647 (1974).
- ⁹ Laouini A, Jaafar-Maalej, Limayem-Bloiza, S.Sfar, Charcosset, H.Fessi, "Preparation, Characterization, and Applications of Liposomes: State of the Art" *Journal of Colloid Science and Biotechnology* **1**, 147-168 (2012).
- ¹⁰ Wagner A, Vorauer-Uhl, "Liposome technology for industrial purposes" *Journal of Drug Delivery* **2011**, 591325 (2011).
- ¹¹ Hyodo K, Yamamoto, Suzuki, Kikuchi, Asano, Ishihara, "Development of liposomal anticancer drugs" *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **36**(5), 703-707 (2013).
- ¹² Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady, Davaran, Joo, Zarghami, Hanifehpour, Samiei, Kouhi, Nejati-Koshki, "Liposome: classification, preparation, and applications" *Nanoscale Research Letters* **8**(1), 102 (2013).
- ¹³ Vemuri S, Rhodes, "Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review" *Pharmaceutica Acta Helveticae* **70**(2), 95-111 (1995).
- ¹⁴ Stano P, Bufali, Pisano, Bucci, Barbarino, Santaniello, Carminati, Luisi, "Novel camptothecin analogue (gimatecan)-containing liposomes prepared by the ethanol injection method" *Journal of Liposome Research* **14**(1-2), 87-109 (2004).
- ¹⁵ Holzer M, Barnert, Momm, Schubert, "Preparative size exclusion chromatography combined with detergent removal as a versatile tool to prepare unilamellar and spherical liposomes of highly uniform size distribution" *Journal of Chromatography A* **1216**(31), 5838-5848 (2009).
- ¹⁶ Mui B, Chow, Hope, "Extrusion technique to generate liposomes of defined size" *Methods in Enzymology* **367**, 3-14 (2003).
- ¹⁷ Hatlo MM, R.van Roij, Lue, "The electric double layer at high surface potentials: The influence of excess ion polarizability" *Europhysics Letters (EPL)* **97**, 1-6 (2012).
- ¹⁸ Sharma A, Sharma, "Liposomes in drug delivery: progress and limitations" *International Journal of Pharmaceutics* **154**, 123-140 (1997).
- ¹⁹ Hafez IM, Cullis, "Cholesteryl hemisuccinate exhibits pH sensitive polymorphic phase behavior" *Biochimica Et Biophysica Acta* **1463**(1), 107-114 (2000).

- ²⁰ Guo X, Szoka, "Steric stabilization of fusogenic liposomes by a low-pH sensitive PEG-diortho ester-lipid conjugate" *Bioconjugate Chemistry* **12**(2), 291-300 (2001).
- ²¹ Immordino ML, Dosio, Cattell, "Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential" *International Journal of Nanomedicine* **1**(3), 297-315 (2006).
- ²² Zhao Y, Alakhova, Kim, Bronich, Kabanov, "A simple way to enhance Doxil(R) therapy: drug release from liposomes at the tumor site by amphiphilic block copolymer" *Journal of Controlled Release* **168**(1), 61-69 (2013).
- ²³ Luxenhofer R, Han, Schulz, Tong, He, Kabanov, Jordan, "Poly(2-oxazoline)s as polymer therapeutics" *Macromolecular Rapid Communications* **33**(19), 1613-1631 (2012).
- ²⁴ Chang HI, Yeh, "Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy" *International Journal of Nanomedicine* **7**, 49-60 (2012).
- ²⁵ Hume DA, Ross, Himes, Sasmono, Wells, Ravasi, "The mononuclear phagocyte system revisited" *Journal of Leukocyte Biology* **72**(4), 621-627 (2002).
- ²⁶ Kelly C, Jefferies, Cryan, "Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages" *Journal of Drug Delivery* **2011**, 727241 (2011).
- ²⁷ Allen TM, Hansen, Lopes de Menezes, "Pharmacokinetics of long-circulating liposomes" *Advanced Drug Delivery Reviews* **16**, 267-284 (1995).
- ²⁸ Zhao G, Rodriguez, "Molecular targeting of liposomal nanoparticles to tumor microenvironment" *International Journal of Nanomedicine* **8**, 61-71 (2013).
- ²⁹ Park JW, Hong, Kirpotin, Colbern, Shalaby, Baselga, Shao, Nielsen, Marks, Moore, Papahadjopoulos, Benz, "Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery" *Clinical Cancer Research* **8**(4), 1172-1181 (2002).
- ³⁰ Mamot C, Ritschard, Wicki, Stehle, Dieterle, Bubendorf, Hilker, Deuster, Herrmann, Rochlitz, "Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study" *Lancet Oncology* **13**(12), 1234-1241 (2012).
- ³¹ Allen TM, Mumbengegwi, Charrois, "Anti-CD19-targeted liposomal doxorubicin improves the therapeutic efficacy in murine B-cell lymphoma and ameliorates the toxicity of liposomes with varying drug release rates" *Clinical Cancer Research* **11**(9), 3567-3573 (2005).
- ³² Sugano M, Egilmez, Yokota, Chen, Harding, Huang, Bankert, "Antibody targeting of doxorubicin-loaded liposomes suppresses the growth and metastatic spread of established human lung tumor xenografts in severe combined immunodeficient mice" *Cancer Research* **60**(24), 6942-6949 (2000).
- ³³ Siwak DR, Tari, Lopez-Berestein, "The potential of drug-carrying immunoliposomes as anticancer agents. Commentary re: J. W. Park et al., Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy due to targeted delivery. *Clin. Cancer Res.*, 8: 1172-1181, 2002" *Clinical Cancer Research* **8**(4), 955-956 (2002).
- ³⁴ Rouslahti E, Bhatia, Sailor, "Targeting of drugs and nanoparticles to tumors" *Journal of Cell Biology* **188**, 759-768 (2010).
- ³⁵ Aina OH, Sroka, Chen, Lam, "Therapeutic cancer targeting peptides" *Biopolymers* **66**(3), 184-199 (2002).
- ³⁶ Hatakeyama H, Akita, Harashima, "The Polyethyleneglycol Dilemma: Advantage and Disadvantage of PEGylation of Liposomes for Systemic Genes and Nucleic Acids Delivery to Tumors" *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **36**(6), 892-899 (2013).
- ³⁷ Park BW, Zhang, Wu, Berezov, Zhang, Dua, Wang, Kao, O'Rourke, Greene, Murali, "Rationally designed anti-HER2/neu peptide mimetic disables p185(HER2/neu) tyrosine kinases in vitro and in vivo" *Nature Biotechnology* **18**(2), 194-198 (2000).

- 38 Ellerby HM, Bredesen, Fujimura, John, "Hunter-killer peptide (HKP) for targeted therapy" *Journal of Medicinal Chemistry* **51**(19), 5887-5892 (2008).
- 39 Penate MO, Haikola, Tahtinen, Simpura, Kaukinen, Valtanen, Zhu, Kuosmanen, Cao, Reunanen, Nurminen, Saris, Smith-Jones, Bradbury, Larson, Kairemo, "Liposomal Tumor Targeting in Drug Delivery Utilizing MMP-2- and MMP-9-Binding Ligands" *Journal of Drug Delivery* **2011**, 160515 (2011).
- 40 MacKinnon AC, Waters, Rahman, Harani, Rintoul, Haslett, Sethi, "[Arg(6), D-Trp(7,9), N(me)Phe(8)]-substance P (6-11) (antagonist G) induces AP-1 transcription and sensitizes cells to chemotherapy" *British Journal of Cancer* **83**(7), 941-948 (2000).
- 41 Moreira JN, Gaspar, "Antagonist G-mediated targeting and cytotoxicity of liposomal doxorubicin in NCI-H82 variant small cell lung cancer" *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **37**(8), 1185-1192 (2004).
- 42 Moreira JN, Hansen, Gaspar, Allen, "A growth factor antagonist as a targeting agent for sterically stabilized liposomes in human small cell lung cancer" *Biochimica Et Biophysica Acta* **1514**(2), 303-317 (2001).
- 43 Qhattal HSS, Liu, "Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes" *Molecular Pharmaceutics* **8**(4), 1233-1246 (2011).
- 44 Yoshizawa T, Hattori, Hakoshima, Koga, Maitani, "Folate-linked lipid-based nanoparticles for synthetic siRNA delivery in KB tumor xenografts" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **70**(3), 718-725 (2008).
- 45 Zhang ZQ, Yao, "Preparation of Irinotecan-Loaded Folate-Targeted Liposome for Tumor Targeting Delivery and Its Antitumor Activity" *Aaps Pharmscitech* **13**(3), 802-810 (2012).
- 46 Wu J, Liu, Lee, "A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel" *International Journal of Pharmaceutics* **316**(1-2), 148-153 (2006).
- 47 Gabizon A, Horowitz, Goren, Tzemach, Mandelbaum-Shavit, Qazen, Zalipsky, "Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: In vitro studies" *Bioconjugate Chemistry* **10**(2), 289-298 (1999).
- 48 Gao W, Xiang, Meng, Liu, Qi, "Chemotherapeutic drug delivery to cancer cells using a combination of folate targeting and tumor microenvironment-sensitive polypeptides" *Biomaterials* **34**(16), 4137-4149 (2013).
- 49 Zhao R, Matherly, Goldman, "Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues" *Expert Reviews in Molecular Medicine* **11**, e4 (2009).
- 50 Elnakat H, Ratnam, "Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy" *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**(8), 1067-1084 (2004).
- 51 Stefanick JF, Ashley, Bilgicer, "Enhanced cellular uptake of peptide-targeted nanoparticles through increased peptide hydrophilicity and optimized ethylene glycol peptide-linker length" *Acs Nano* **7**(9), 8115-8127 (2013).
- 52 Stefanick JF, Ashley, Kiziltepe, Bilgicer, "A Systematic Analysis of Peptide Linker Length and Liposomal Polyethylene Glycol Coating on Cellular Uptake of Peptide-Targeted Liposomes" *Acs Nano* **7**(4), 2935-2947 (2013).
- 53 Shahin M, Soudy, Aliabadi, Kneteman, Kaur, Lavasanifar, "Engineered breast tumor targeting peptide ligand modified liposomal doxorubicin and the effect of peptide density on anticancer activity" *Biomaterials* **34**(16), 4089-4097 (2013).
- 54 Maeda N, Takeuchi, Takada, Sadzuka, Namba, Oku, "Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted long-circulating liposome" *Journal of Controlled Release* **100**(1), 41-52 (2004).
- 55 Popovtzer R, Agrawal, Kotov, Popovtzer, Balter, Carey, Kopelman, "Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer" *Nano Letters* **8**(12), 4593-4596 (2008).

- ⁵⁶ Chan P, Kurisawa, Chung, Yang, "Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery" *Biomaterials* **28**(3), 540-549 (2007).
- ⁵⁷ Jie LY, Cai, Wang, Ying, Yu, Zhang, Du, "Actively-targeted LTVSPWY peptide-modified magnetic nanoparticles for tumor imaging" *International Journal of Nanomedicine* **7**, 3981-3989 (2012).
- ⁵⁸ Mathews AS, Ahmed, Shahin, Lavasanifar, Kaur, "Peptide Modified Polymeric Micelles Specific for Breast Cancer Cells" *Bioconjugate Chemistry* **24**(4), 560-570 (2013).
- ⁵⁹ Yao L, Daniels, Wijesinghe, Andreev, Reshetnyak, "pHLIP (R)-mediated delivery of PEGylated liposomes to cancer cells" *Journal of Controlled Release* **167**(3), 228-237 (2013).
- ⁶⁰ Hamano N, Negishi, Fujisawa, Manandhar, Sato, Katagiri, Nomizu, Aramaki, "Modification of the C16Y peptide on nanoparticles is an effective approach to target endothelial and cancer cells via the integrin receptor" *International Journal of Pharmaceutics* **428**(1-2), 114-117 (2012).
- ⁶¹ Getz EB, Xiao, Chakrabarty, Cooke, Selvin, "A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry" *Analytical Chemistry* **71**(1), 73-80 (1999).
- ⁶² Gao JQ, Lv, Li, Tang, Li, Hu, Han, "Glioma targeting and blood-brain barrier penetration by dual-targeting doxorubicin liposomes" *Biomaterials* **34**(22), 5628-5639 (2013).
- ⁶³ Doherty GJ, McMahon, "Mechanisms of endocytosis" *Annuals Review of Biochemistry* **78**, 857-902 (2009).
- ⁶⁴ Kumari S, Swetha, Mayor, "Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell" *Cell Research* **20**(3), 256-275 (2010).
- ⁶⁵ Iversen TG, Skotland, Sandvig, "Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies" *Nano Today* **6**(2), 176-185 (2011).
- ⁶⁶ Canton I, Battaglia, "Endocytosis at the nanoscale" *Chemical Society Reviews* **41**(7), 2718-2739 (2012).
- ⁶⁷ Miller CR, Bondurant, McLean, McGovern, O'Brien, "Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes" *Biochemistry* **37**(37), 12875-12883 (1998).
- ⁶⁸ Barua S, Rege, "Cancer-cell-phenotype-dependent differential intracellular trafficking of unconjugated quantum dots" *Small* **5**(3), 370-376 (2009).
- ⁶⁹ Harush-Frenkel O, Rozentur, Benita, Altschuler, "Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells" *Biomacromolecules* **9**(2), 435-443 (2008).
- ⁷⁰ Thomas CM, Smart, "Caveolae structure and function" *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **12**(3), 796-809 (2008).
- ⁷¹ Zhao R, Goldman, "Folate and thiamine transporters mediated by facilitative carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and folate receptors" *Molecular Aspects of Medicine* **34**(2-3), 373-385 (2013).
- ⁷² Sabharanjak S, Mayor, "Folate receptor endocytosis and trafficking" *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**(8), 1099-1109 (2004).
- ⁷³ Ritter TE, Fajardo, Matsue, Anderson, Lacey, "Folate receptors targeted to clathrin-coated pits cannot regulate vitamin uptake" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(9), 3824-3828 (1995).
- ⁷⁴ Lu RM, Chen, Chang, Chiu, Lin, Yan, Wang, Kuo, Yeh, Lo, Wu, "Targeted Drug Delivery Systems Mediated by a Novel Peptide in Breast Cancer Therapy and Imaging" *PLOS One* **8**(6) (2013).
- ⁷⁵ Rudolph C, Lausier, Naundorf, Muller, Rosenecker, "In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers" *Journal of Gene Medicine* **2**(4), 269-278 (2000).

- ⁷⁶ Miron T, Wilchek, "A spectrophotometric assay for soluble and immobilized N-hydroxysuccinimide esters" *Analytical Chemistry* **126**(2), 433-435 (1982).
- ⁷⁷ Ponder EL, Fried, Sherma, "Thin-layer chromatographic analysis of hydrophilic vitamins in standards and from *Helisoma trivolvis* snails" *Acta Chromatographica* **14**, 70-81 (2004).
- ⁷⁸ Bhushan R, Parshad, "Improved separation of vitamin B complex and folic acid using some new solvent systems and impregnated TLC" *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **22**, 1607-1623 (1999).
- ⁷⁹ Sedlak J, Lindsay, "Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent" *Analytical Biochemistry* **25**(1), 192-205 (1968).
- ⁸⁰ Riddles PW, Blakeley, Zerner, "Reassessment of Ellman's reagent" *Methods in Enzymology* **91**, 49-60 (1983).
- ⁸¹ Collier HB, "Letter: A note on the molar absorptivity of reduced Ellman's reagent, 3-carboxylato-4-nitrothiophenolate" *Analytical Chemistry* **56**(1), 310-311 (1973).
- ⁸² Rouser G, Fiskecher, Yamamoto, "Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots" *Lipids* **5**(5), 494-496 (1970).
- ⁸³ Untergasser A, Cutcutache, Koressaar, Ye, Faircloth, Remm, Rozen, "Primer3--new capabilities and interfaces" *Nucleic Acids Research* **40**(15), e115 (2012).
- ⁸⁴ Koressaar T, Remm, "Enhancements and modifications of primer design program Primer3" *Bioinformatics* **23**(10), 1289-1291 (2007).
- ⁸⁵ Wu Z, Li, Hou, Qian, "Solubility of Folic Acid in Water at pH Values between 0 and 7 at Temperatures (298.15, 303.15, and 313.15) K" *Journal of Chemical and Engineering Data* **55**, 3958-3961 (2010).
- ⁸⁶ Gorry A, "General least-squares smoothing and differentiation by the convolution (Savitzky-Golay) method" *Analytical Chemistry* **62**, 570-573 (1990).
- ⁸⁷ Thomas AH, Lorente, Capparelli, Pokhrel, Braun, Oliveros, "Fluorescence of pterin, 6-formylpterin, 6-carboxypterin and folic acid in aqueous solution: pH effects" *Photochemical & Photobiological Sciences* **1**(6), 421-426 (2002).
- ⁸⁸ Ho JAA, Hung, Wu, Liao, "Folic Acid-Anchored PEGylated Phospholipid Bioconjugate and Its Application in a Liposomal Immunodiagnostic Assay for Folic Acid" *Analytical Chemistry* **81**(14), 5671-5677 (2009).
- ⁸⁹ Gocan S, "Stationary Phases for Thin-Layer Chromatography" *Journal of Chromatographic Science* **40**, 1-12 (2002).
- ⁹⁰ Neises B, W. Steglich, "Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids" *Angewandte Chemie* **17**, 522-524 (1978).
- ⁹¹ Corvo ML, Marinho, Marcelino, Lopes, Vale, Marques, Martins, Laverman, Storm, Martins, "Superoxide Dismutase Enzymosomes: Carrier Capacity Optimization, in Vivo Behaviour and Therapeutic Activity" *Pharmaceutical Research* *in press* (2014).
- ⁹² de Menorval MA, Mir, Fernandez, Reigada, "Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells" *PLOS One* **7**(7), e41733 (2012).
- ⁹³ Gurtovenko AA, Anwar, "Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide" *The Journal of Physical Chemistry B* **111**(35), 10453-10460 (2007).
- ⁹⁴ M. C. Carvalheiro, *Liposomes as Nanosystems for the Transport and Delivery of Bioactive Agents* Doutoramento em Farmácia (Tecnologia Farmacéutica) , Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2010.

- ⁹⁵ Moreira JN, Ishida, Gaspar, Allen, "Use of the post-insertion technique to insert peptide ligands into pre-formed stealth liposomes with retention of binding activity and cytotoxicity" *Pharmaceutical Research* **19**(3), 265-269 (2002).
- ⁹⁶ Chen H, Ahn, Van den Bossche, Thompson, O'Halloran, "Folate-mediated intracellular drug delivery increases the anticancer efficacy of nanoparticulate formulation of arsenic trioxide" *Molecular Cancer Therapeutics* **8**(7), 1955-1963 (2009).
- ⁹⁷ Wang X, Yao, Ahn, Zhang, Bondar, Torres, Belfield, "Folate receptor targeting silica nanoparticle probe for two-photon fluorescence bioimaging" *Biomedical Optics Express* **1**(2), 453-462 (2010).
- ⁹⁸ Douglas KL, Piccirillo, Tabrizian, "Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **68**(3), 676-687 (2008).
- ⁹⁹ Pollock S, Antrobus, Newton, Kampa, Rossa, Latham, Nichita, Dwek, Zitzmann, "Uptake and trafficking of liposomes to the endoplasmic reticulum" *FASEB Journal* **24**(6), 1866-1878 (2010).
- ¹⁰⁰ Paulos CM, Reddy, Leamon, Turk, Low, "Ligand binding and kinetics of folate receptor recycling in vivo: impact on receptor-mediated drug delivery" *Molecular Pharmacology* **66**(6), 1406-1414 (2004).
- ¹⁰¹ F. Fischbach and MB Dunning, *Manual of laboratory and diagnostic tests*, 8th ed., Lippincott Williams; Wilkins, Philadelphia, 2008.

ANEXOS/APPENDICES

APPENDIX 1: Poster Communication for “CQB Day”

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 09/07/2014

Active targeting of tumor cells using folic acid-labeled long circulating liposomes: an *in vitro* study

Denys Holovanchuk^{a,b}, Carla Real^a, M. Bárbara F. Martins^b, H. Susana Marinho^a, M. Luísa Corvo^b

^a Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 1749-016 Lisboa, Portugal, smarinho@fc.ul.pt;

^b Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003, Lisboa, lcorvo@ff.ul.pt

Drug delivery systems targeted to tumor cells are an ever-growing field in cancer research. Clinically, one of the most successful strategies to improve efficacy and specificity consists of employing long circulating liposomes as drug carriers. The presence of poly-(ethylene glycol) (PEG) on the surface of the liposomal carrier allows membrane stabilization, decreases protein-liposome interactions and allows surface modification with ligands or antibodies that recognize cell-specific receptors or antigens, respectively. One of the most commonly and successfully employed targeting molecules is folic acid. This small molecule binds with high affinity to folate receptors, overexpressed in a wide variety of human tumors. The present study is addressed to develop a simple and unique method of linking covalently a target molecule to the surface of pre-formed PEGylated liposomes. This approach enables an anti-cancer loaded formulation to be targeted to different specific cell receptors dependent on the characteristics of the patient tumor. Folate grafted liposomes are already acknowledged as a very promising agents for tumor drug delivery or imaging techniques. Yet, most of the studies use commercially available 1,2-distearoylphosphatidylethanolamine-PEG-2000-folate (DSPE-PEG₂₀₀₀-fol) or synthesize this lipid prior to liposome preparation. Here, the protocol of grafting liposomes with folic acid *after* their preparation was studied and optimized. For this purpose, folic acid was activated with a sulfhydryl group and linked to liposomes, containing DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide. The liposomes were characterized for their size and zeta potential. Conjugation of folic acid to the liposomes did not alter any of these parameters. The ongoing work also aims at optimizing the *in vitro* internalization of liposomes by cells, using HeLa cells which overexpress the folate receptor- α and MCF-7 cells, which do not overexpress this receptor. HeLa cells were cultured in the presence of liposomes (labeled with L- α -phosphatidylethanolamine-n-(lissamine rhodamine B sulfonyl) with or without folic acid and visualized, using fluorescence microscopy. Preliminary studies showed a very strong adhesion of liposomes with folic acid to the coverslip containing confluent HeLa cells, in contrast to liposomes without folic acid. These results are promising regarding our aim of achieving similar internalization results as compared to the liposomes prepared with commercially available DSPE-PEG₂₀₀₀-folate.

Acknowledgements

FCT (grants PEst-OE/QUI/UI0612/2013; PEst-OE/SAU/UI4013/2011 and PEst-OE/SAU/UI4013/2014).

REFERENCES: 1. Jayashree Arcot, Ashok Shrestha, *Folate: methods of analysis* (2005), Trends in Food Science & Technology **16**, 253-266; 2. Chen Chen, Jiyuan Ke, *et al*, *Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors* (2013), NATURE **500**, 486-490; 3. Peggy Chan, Motoichi Kurisawa, *et al*, *Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery* (2007), Biomaterials **28**, 540-549

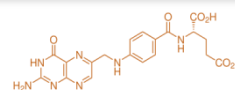
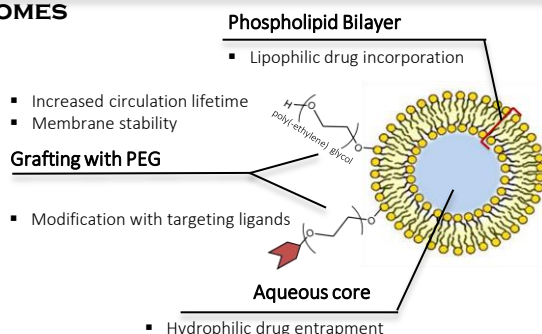
Denys Holovanchuk^{a,b}, Carla Real^a, M. Bárbara F. Martins^b, H. Susana Marinho^a, M. Luísa Corvo^a

^a Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 1749-016 Lisboa, Portugal

^b Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003, Lisboa, Portugal

INTRODUCTION

LIPOSOMES



FOLIC ACID

Figure 1. Chemical structure of folic acid

- B9 family vitamin is a very important one carbon donor for synthesis and methylation of organic compounds¹
- Binds with very high affinity to folate receptors (FR α , FR β and FR γ , $K_d < 1$ nM), highly expressed in numerous tumors, in contrast to healthy tissue²

The present study is aimed at developing a simple and unique method of covalently linking folic acid to the surface of pre-formed PEGylated liposomes and test their internalization *in vitro* by HeLa and MCF7 cell lines.

METHODS

Liposomes were prepared by the dehydration-rehydration method,^(CS) was also used for liposome preparation. according to the formulations in Table 1, and sized by extrusion up to 0.1 μ m. Folic acid was activated with a sulfhydryl group, as depicted in figure 2 and added to liposome suspensions in a molar ratio 10:1 (Folic acid : DSPE-PEG-fol). Commercially available DSPE-PEG-fol^{(Nano}

RESULTS

Table 1. Composition of the liposomal formulations

Formulation	Molar ratio
EggPC : Chol : DSPE-PEG ₂₀₀₀ : PE-rhod	2.2 : 1 : 0.040 : 0.002
EggPC : Chol : DSPE-PEG ₂₀₀₀ : DSPE-PEG ₂₀₀₀ -mal : PE-rhod	2.2 : 1 : 0.016 : 0.024 : 0.002
EggPC : Chol : DSPE-PEG ₂₀₀₀ : DSPE-PEG ₂₀₀₀ -fol : PE-rhod	2.2 : 1 : 0.029 : 0.011 : 0.002

EggPC: Egg-phosphatidylcholine; DSPE-PEG₂₀₀₀: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000]; Chol: cholesterol; DSPE-PEG₂₀₀₀-mal: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyethylene glycol)-2000]; DSPE-PEG-fol: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[folic acid (polyethylene glycol)-2000]; PE-rhod: Egg Liss Rhod PE L- α -Phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)^(Nanotek)

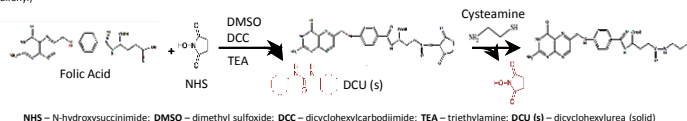


Figure 2. Mechanism of activation of folic acid with a sulfhydryl group

Table 2. Hydrodynamic diameter (D_H), polydispersity index (PDI), zeta potential (ζ), folic acid to total lipid ratio of liposomes before and after reaction with folic acid³

Formulation	D_H (nm)	PDI	ζ (mV)	Folic Acid/ Total Lipid
EggPC:Chol:DSPE-PEG:PE-rhod	136	0.074	-1.6	-
EggPC:Chol:DSPE-PEG: DSPE-PEG-mal : PE-rhod (prior to reaction with Folic Acid-SH)	136	0.056	-0.5	-
EggPC:Chol:DSPE-PEG: DSPE-PEG-mal : PE-rhod (after reaction with Folic Acid-SH)	157	0.078	0.1	0.001
EggPC:Chol:DSPE-PEG:DSPE-PEG-fol:PE-rhod (commercial DSPE-PEG-fol)	138	0.081	-1.0	0.006

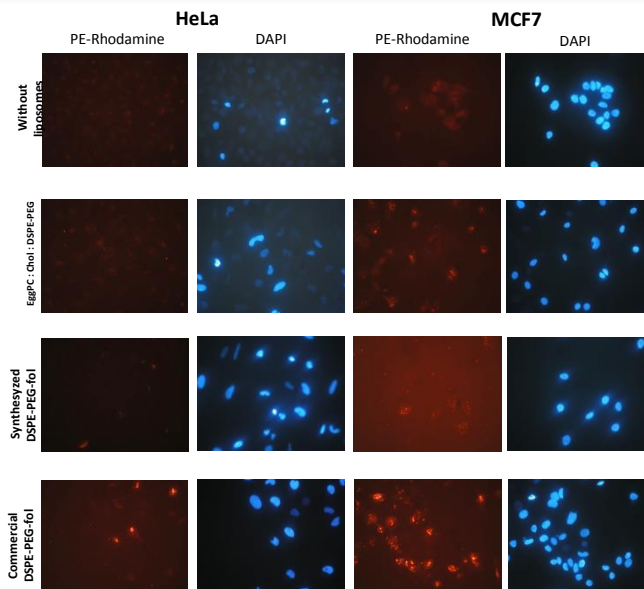


Figure 3: Fluorescence microscopy images of HeLa and MCF7 cells after 1 hour of incubation in presence of liposomes with or without covalently linked folic acid 500 μ M (total lipid concentration). Cells were fixed with 2% paraformaldehyde and cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

CONCLUSIONS

Folic Acid was successfully linked to the surface of liposomes, although with a low yield (only 10% of maleimide groups reacted). Thus, the coupling technique needs further optimization. The lower internalization of liposomes with synthesized DSPE-PEG-fol as compared to the commercial lipid could be explained by the low

efficiency of synthesis. The ongoing work is aimed at optimization of grafting protocol as well as at assessing FR expression in tested cell lines, since a relatively high uptake of folate grafted liposomes was also observed in MCF7 cells.

APPENDIX 2: Data to be published

Active targeting of Lung Tumor Cells using Antagonist G-labeled Long
Circulating Liposomes: an *in vitro* study

ACTIVE TARGETING OF LUNG TUMOR CELLS USING ANTAGONIST G-Labeled LONG CIRCULATING LIPOSOMES: AN *IN VITRO* STUDY

INTRODUCTION

Antagonist G

- Neuropeptide analogue
- Selectivity to a wide variety of neuropeptide receptors, overexpressed in Small Cell Lung Carcinoma (SCLC) tumors

METHODS

Liposomes were prepared by the dehydration-rehydration method, according to the formulations in Table 1, and sized by extrusion up to 0.1 μm . Antagonist G peptide was activated with a sulfhydryl group and added to liposome suspensions in a molar ratio 1.4:1 (Folic acid : DSPE-PEG-mal) resulting in peptide directed liposomes prepared by the direct coupling. Alternatively, DSPE-PEG-mal micelles were prepared in order to covalently couple antagonist G (1:1,4 mol peptide:DSPE-PEG-mal). After the linkage reaction, micelles were added to liposomal suspension, resulting in antagonist G directed liposomes prepared by the post insertion method, as depicted in figure 1. Liposomes were incubated for 1 and 3 h with H69 cells and the internalization was observed using a fluorescence microscope.

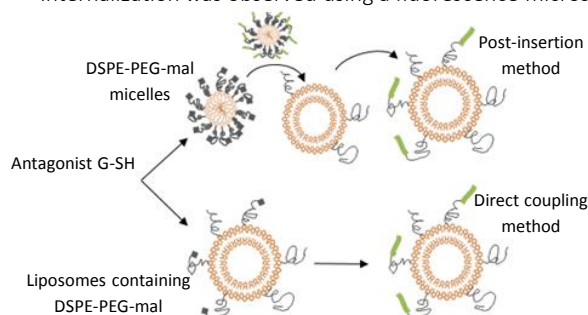


Figure 1. Schematic representation of two different methods used to covalently link antagonist G activated with a sulfhydryl group to liposomes

RESULTS

Table 2. Hydrodynamic diameter (DH), polydispersion index (PDI) and ζ potential of prepared liposomes. NT – non-targeted, DIR – antagonist G targeted prepared by direct coupling, INS – antagonist G targeted prepared by post-insertion method

Liposomes	D_H (μm)	PDI	ζ (mV)
NT	0.14	0.081	-1.5
DIR	0.15	0.093	-0.8
INS	0.14	0.060	-1.4

Table 3. Antagonist G (AntG) and total lipid concentration of prepared liposomes

	Pos-insertion method	Direct Coupling method
[AntG] mM	0.03	0.05
[Total Lipid] mM	9.8	10.6
AntG/Total Lipid (%mol)	0.29	0.50
AntG/maleimide (% mol)	41.4	71.4

CONCLUSIONS

Antagonist G peptide was successfully linked to the surface of liposomes with a high yield, using both methods. In fact, 41 and 71 % mol antagonist G/maleimide is a very high value, considering that not all maleimide groups are located at the liposomal surface upon liposome preparation.

Clear differences were observed in internalization of non targeted and targeted liposomes in H69 cells. However, there is no clear distinction in the internalization of liposomes prepared by the two different methods. To further investigate this question, quantitative studies are required.

Table 1. Composition of the liposomal formulations. NT – non targeted; DIR – antagonist G targeted prepared by direct coupling; INS – antagonist G targeted prepared by post insertion method

Formulation	Molar ratio
EggPC : Chol : DSPE-PEG ₂₀₀₀ : PE-rhod (NT)	2.2 : 1:0.040:0.002
EggPC : Chol : DSPE-PEG ₂₀₀₀ : DSPE-PEG ₂₀₀₀ -mal : PE-rhod (DIR)	2.2:1:0.016:0.024:0.002
EggPC : Chol : DSPE-PEG ₂₀₀₀ : PE-rhod (INS)	2.2:1:0.029:0.002

EggPC - Egg-phosphatidylcholine; DSPE-PEG₂₀₀₀ - 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(methoxy (polyethylene glycol)-2000); Chol - cholesterol; DSPE-PEG₂₀₀₀-mal - 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(maleimide (polyethylene glycol)-2000); PE - Egg Liss Rhod PE L- α -Phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)-Methyl Polar Lipids

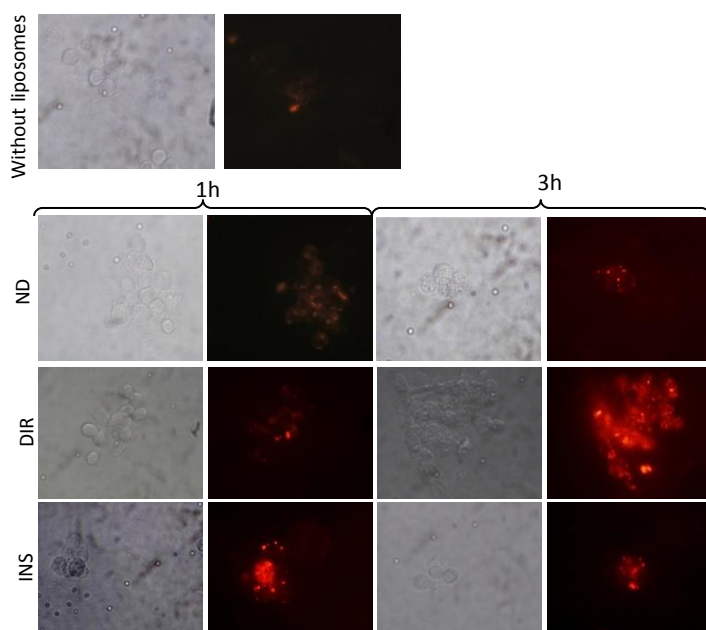


Figure 2: Fluorescence microscopy images of H69 cells after 1 and 3 h of incubation in presence of non targeted liposomes (NT), antagonist G targeted liposomes prepared by direct coupling (DIR) and by post-insertion method (INS). Total lipid concentration – 500 μM